

Aus dem Pathologischen Institut  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Professor Dr. T. Kirchner

**Immunhistochemische und molekulare Untersuchungen BRCA1/2 mutierter  
Ovarialkarzinome  
Korrelation der gewonnenen Daten mit den klinischen Daten, den histologischen Befunden  
und dem Überleben**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Sarah Landgrebe  
aus Kassel

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Doris Mayr

Mitberichterstatter: Priv.Do. Dr. med T. Kolbe  
Priv. Doz. Dr. med Stefan Hutter

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Elisa Schmoeckel

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2021

Meinen Eltern

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen.....</b>	<b>- 2 -</b>
2.1	Das Ovarialkarzinom.....	- 2 -
2.1.1	Epidemiologie und Ätiologie des Ovarialkarzinoms .....	- 2 -
2.1.2	Klassifikation des Ovarialkarzinoms .....	- 4 -
2.1.3	Grading des Ovarialkarzinoms.....	- 6 -
2.1.4	Erbliche Formen des Ovarialkarzinoms.....	- 8 -
2.1.5	Klinik und Symptome .....	- 9 -
2.1.6	Diagnostik und Staging .....	- 10 -
2.1.7	Therapie.....	- 14 -
2.1.8	Prognose und Prävention.....	- 17 -
2.2	BRCA Gene 1 und 2.....	- 18 -
2.2.1	Genlokalisierung und Aufbau.....	- 18 -
2.2.2	Funktion der BRCA1 und BRCA2 Gene sowie deren Proteine.....	- 19 -
2.2.3	Genetische Testung .....	- 27 -
2.2.4	Polyadenosin-5'-diphosphoribose-Polymerase (PARP)-Inhibitor Behandlung bei Frauen mit positivem BRCA Status .....	- 30 -
2.2.5	Früherkennungs- und Prophylaxemaßnahmen.....	- 32 -
2.2.5.1	Früherkennung.....	- 32 -
2.2.5.2	Prävention.....	- 32 -
2.2.6	Untersuchte Proteine .....	- 33 -
2.2.6.1	HSPC 142 .....	- 33 -
2.2.6.2	BAP1 .....	- 34 -
2.2.6.3	CtIp.....	- 36 -

2.2.6.4	BAAT-1 .....	- 37 -
2.2.6.5	FANCJ .....	- 38 -
<b>3</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>- 39 -</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>- 39 -</b>
4.1	Patientenkollektiv .....	- 39 -
4.2	Übersicht Patientenkollektiv.....	- 40 -
4.2.1	HGSOVCA-Kollektiv .....	- 40 -
4.2.2	TMA- Kollektiv.....	- 45 -
4.3	Untersuchungsmaterial .....	- 48 -
4.3.1	Geräte, Verbrauchsmaterial und Chemikalien .....	- 49 -
4.4	Immunhistochemie .....	- 51 -
4.4.1	Allgemeines.....	- 51 -
4.4.2	Detektionssysteme.....	- 51 -
4.4.3	Durchführung/ Ablauf.....	- 53 -
4.4.4	Auswertung .....	- 54 -
4.4.4.1	Mikroskopische Auswertung.....	- 55 -
4.4.4.2	Statistische Auswertung .....	- 56 -
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>- 57 -</b>
5.1	Ergebnisse und Auswertung der Immunhistochemie .....	- 57 -
5.1.1	Immunhistochemische Färbung HSPC142 .....	- 57 -
5.1.2	Immunhistochemische Färbung BAAT1 .....	- 60 -
5.1.3	Immunhistochemische Färbung BAP 1.....	- 62 -
5.1.4	Immunhistochemische Färbung FANCJ .....	- 65 -
5.1.5	Immunhistochemische Färbung CtIp .....	- 68 -
5.2	Korrelation von HSPC142, BAP1, FANCJ, BAAT1 und CtIp.....	- 70 -

5.3	Immunhistochemische Färbung CtIP am OVCA- TMA Panel .....	- 72 -
5.3.1	CtIp Expression in Abhängigkeit von der Histologie .....	- 73 -
5.3.2	Proteinexpression in Abhängigkeit vom Grading .....	- 74 -
5.4	Kaplan-Meier-Überlebenskurven .....	- 74 -
5.4.1	Faktor FIGO-Stadium und Grading in der Überlebensfunktion .....	- 74 -
5.4.2	Zytoplasmatische CtIp-Expression in der Überlebensfunktion .....	- 75 -
5.4.3	Nukleäre CtIp- Expression in der Überlebensfunktion .....	- 77 -
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>- 78 -</b>
6.1	Einführung .....	- 78 -
6.2	Diskussion des Materials .....	- 79 -
6.3	Immunhistochemie .....	- 80 -
6.3.1	HSPC .....	- 80 -
6.3.2	CtIp .....	- 81 -
6.3.3	FANCI .....	- 83 -
6.3.4	BAP1 .....	- 85 -
6.3.5	BAAT1 .....	- 86 -
6.4	Korrelationen der Proteinexpression untereinander .....	- 86 -
6.5	CtIp Färbung am TMA-OVCA Panel .....	- 87 -
6.6	Kaplan-Meier-Überlebensanalysen .....	- 88 -
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>- 89 -</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>- 94 -</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>- 110 -</b>
9.1	BRCA-Mutationsanalyse aus dem Softwareprogramm „PathoPro“ .....	- 110 -
9.2	Danksagung .....	- 113 -
9.3	Eidesstattliche Versicherung .....	- 114 -

## Abkürzungsverzeichnis

AGO	Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie
ATM/ATR	Ataxia teleangiectasia mutated kinase/Ataxia teleangiectasia and rad3
BAAT1	BRCA1-associated protein required for ATM activation-1), syn: BRAT1
BABAM 1	BRISC and BRCA1 A complex Member
BACH 1	BTB Domain And CNC Homolog 1
BAP1	BRCA associated protein 1
BARD1	BRCA1 associated RING Domain 1
BIC	Breast Cancer Information Core
BRAF	rapidly accelerated fibrosarcoma type B
BRIP1	BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helicase 1, syn: FANCI
BRCA	Breast Cancer
BRCA1A	Breast Cancer 1 A Komplex
BRCC	BRCA1- BRCA2 - containing complex
BRCT	BRCA1 terminale Domäne
CA 125	Cancer-Antigen 125
CHECK1	Checkpoint Kinase 1
CTDP	cyclical target strand-displacement polymerization
CtIp	CtBP Interacting Protein
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DHPLC	Denaturing high pressure liquid chromatography
DUB	Deubiquitinierendes Enzym
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EOC	Epithelial ovarian cancer
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FAM175A	BRCA1 A Complex Subunit, syn: ABRAXAS
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
GEKO	Richtlinie der Gendiagnostik-Kommission
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
H2AX	H2A histone family member X
HCFC1	Host Cell Factor c1
HGSOVCA	high-grade seröses Ovarialkarzinom
HPF	high power fields
HR	Homologe Rekombination
HRP	Horseradish Peroxidase
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICH	Immunhistochemie
IOTA	International Ovarian Tumor Analysis
IRIF	Ionizing Radiation-Induced Foci
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
K63	spezifischer Lysinrest
LOF	Loss of function
MDC1	Mediator Of DNA Damage Checkpoint 1
MERIT 40	Mediator Of Rap80 Interactions And Targeting 40 KDa, syn. BABAM1
MLH1	DNA-Mismatch-Reparaturprotein

MRN	MRE11-RAD50-NBS1-Komplex
MRT	Magnetresonanztomographie
MSH6	MutS Homolog
NACT	neoadjuvante Chemotherapie
NGS	Next-Generation-Sequencing
NH2	Aminogruppe
NHEJ	non-homologous end joining
OCCR	Ovarian Cancer Cluster Region
OVCA	Ovarialkarzinom
PALP2	Partner And Localizer of BRCA2
PARP	Poly(ADP-Ribose) -Polymerase
PFS	progression free survival
PKC	Protein Kinase C
PpZ	Prozentsatz positiver Zellen
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RAD51C	Rekombinationsfaktor 51C
RAP80	BRCA1-A complex subunit protein
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonucleid acid
RNF8	E3 ubiquitin ligase RING finger protein 8
SMC1	Structural Maintenance of Chromosomes protein 1
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ssDNA	single strand desoxyribonucleic acid
STIC	serous tubal intraepithelial carcinoma
SWI/SMF	SWItch/Sucrose Non-fermentable
TNM	Klassifikation, T=Tumor, N=Nodus, M=Metastasen
TP53	Tumorsuppressorprotein 53
TRB3	Tribbles Homolog 3 (Drosophila) Antikörper
UBC13	ubiquitin-conjugating enzyme 13
UCH	ubiquitin carboxy-terminal hydrolases
UIM	Ubiquitin-interacting Motif
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation



## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Einteilung der Ovarialkarzinome in Typ 1 und Typ 2 nach Kurman .....	- 5 -
Tabelle 2: Histologische Einteilung ovarieller Neoplasien .....	- 6 -
Tabelle 3: Grading nach Silverberg .....	- 7 -
Tabelle 4: Graduierungssystem nach Malpica und Silva.....	- 8 -
Tabelle 5: IOTA Kriterien zur Dignitätseinschätzung von Adnexläsionen („simple rules“) .....	- 11 -
Tabelle 6: aktuelle TMN Klassifikation des Leitlinienprogramms Onkologie, S3 Leitlinie Ovarialkarzinom, Kurzversion, Januar 2019 .....	- 13 -
Tabelle 7: Indikatoren für eine BRCA-Mutationsanalyse .....	- 30 -
Tabelle 8: Altersverteilung Patientenkollektiv .....	- 41 -
Tabelle 9: Klassifizierungssystem für Sequenzvarianten, die per NGS nachgewiesen wurden, Einteilung nach IARC in fünf Klassen .....	- 41 -
Tabelle 10: Prozentuale Verteilung aller Fälle mit Mutation, ohne Mutation und ohne Ergebnis .....	- 42 -
Tabelle 11: Übersicht über die Fälle mit klinisch signifikanter Mutation aus dem Gesamtkollektiv .....	- 43 -
Tabelle 12: Prozentuale Verteilung auf die BRCA-Gene 1 und 2.....	- 44 -
Tabelle 13: Übersicht über das Gesamtkollektiv .....	- 44 -
Tabelle 14: Übersicht histologische Verteilung der Fälle.....	- 47 -
Tabelle 15: Übersicht über verwendete Materialien.....	- 50 -
Tabelle 16: Auflistung der Bestandteile zur Berechnung des immunhistochemischen Scores nach Remmele und Stegner (1987) .....	- 55 -
Tabelle 17: Beispiele zur Färbintensität (Staining intensity).....	- 56 -
Tabelle 18: PpZ HSPC142 zytoplasmatisch .....	- 58 -
Tabelle 19: PpZ HSPC142 nukleär .....	- 58 -
Tabelle 20: PpZ BAAT1 nukleär .....	- 61 -
Tabelle 21: PpZ BAAT1 zytoplasmatisch .....	- 61 -
Tabelle 22: PpZ BAP1 zytoplasmatisch .....	- 63 -
Tabelle 23: PpZ BAP1 nukleär .....	- 63 -
Tabelle 24: PpZ FANCI zytoplasmatisch.....	- 66 -
Tabelle 25: PpZ FANCI nukleär.....	- 67 -
Tabelle 26: PpZ CtIp zytoplasmatisch.....	- 69 -
Tabelle 27: PpZ CtIp nukleär.....	- 69 -
Tabelle 28: Übersicht über die Mediane pro Färbereaktion .....	- 70 -

Tabelle 29: Korrelation des Prozentsatzes positiver Zellen im Zytoplasma von BAAT1 und BAP1.....	- 71 -
Tabelle 30: Korrelation des Prozentsatzes positiver Zellen im Zytoplasma BAAT1 und FANCI.....	- 71 -
Tabelle 31: Korrelation zwischen IRS FANCI nukleär und IRS HSPC142 zytoplasmatisch.....	- 72 -
Tabelle 32: IRS Werte der Ctip Färbung im Zytoplasma in Abhängigkeit von der Histologie.....	- 73 -

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inzidenz OVCA in Deutschland .....	- 2 -
Abbildung 2: Anteil somatischer und keimbahnmutierter BRCA-Mutationen .....	- 9 -
Abbildung 3: Anteil verschiedener high risk und low risk Gene an der Entstehung von hereditärem Eierstockkrebs.....	- 9 -
Abbildung 4: Lokalisierung der BRCA-Gene auf ihren jeweiligen Chromosomen..	- 18 -
Abbildung 5: Schematische Darstellung des BRCA1 Gens. ....	- 19 -
Abbildung 6: Schematische Darstellung des BRCA1/BARD1 Komplexes und der Ubiquitinin aktivierenden Enzyme .....	- 20 -
Abbildung 7: Rolle des BRCA1/BARD1 Komplexes im Transkriptionsvorgang und DNA Reparatur.....	- 21 -
Abbildung 8: Mögliche Wege und Interaktionen bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mit Beteiligung von BRCA1 .....	- 23 -
Abbildung 9: Die Rolle der BRCA-Gene in der DNA Reparatur .....	- 24 -
Abbildung 10: Aufbau BRCA2 Protein im Vergleich zu BRCA1 .....	- 26 -
Abbildung 11: Struktur des BAP1 Gen .....	- 34 -
Abbildung 12: Funktionen von Ctlp im Rahmen der verschiedenen Zellzyklus-Phasen nach Chinnadurai .....	- 37 -
Abbildung 13: Altersverteilung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.....	- 45 -
Abbildung 14: Prozentuale Verteilung Grading .....	- 46 -
Abbildung 15: Prozentuale Verteilung der FIGO Stadien.....	- 46 -
Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der Todesursache .....	- 47 -
Abbildung 17: HE, Fall 20, 400-fache Vergrößerung high-grade seröses OVCA, BRCA-positiv.....	- 48 -
Abbildung 18: Darstellung der Zwei-Schritt-Polymer-Methode.....	- 52 -
Abbildung 19: Vergleich des zytoplasmatischen IR-Scores von HSPC142 in mutierten und nicht mutierten Fällen .....	- 58 -
Abbildung 20: Verteilung der nukleären HSPC142-Expression .....	- 58 -
Abbildung 21: HSPC142, 250-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv ohne Mutation, IRS zytoplasmatisch = 6, keine nukleäre Expression .....	- 59 -
Abbildung 22: HSPC142, 400-fache Vergrößerung, IRS cytoplasmatisch = 6, keine nukleäre Expression .....	- 59 -
Abbildung 23: HSPC142, 250-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv mit Mutation, IRS zytoplasmatisch = 3, keine nukleäre Expression .....	- 60 -
Abbildung 24: Verteilung der zytoplasmatischen BAAT1-Expression.....	- 60 -

Abbildung 25: BAAT1, 100-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv ohne Mutation, IRS nukleär = 12, IRS zytoplasmatisch = 6 .....	- 61 -
Abbildung 26: BAAT1, 100-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv mit Mutation, IRS nukleär = 12, IRS zytoplasmatisch = 6 .....	- 62 -
Abbildung 27: Verteilung der zytoplasmatischen BAP1-Expression.....	- 62 -
Abbildung 28: Verteilung der nukleären BAP1-Expression .....	- 63 -
Abbildung 29: BAP1, 250-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv mit Mutation, IRS zytoplasmatisch = 2, IRS nukleär = 0.....	- 64 -
Abbildung 30: BAP1, 250-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv mit Mutation, IRS nukleär = 3, IRS zytoplasmatisch = 6.....	- 64 -
Abbildung 31: BAP1, 100-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv mit Mutation, IRS nukleär = 0, IRS zytoplasmatisch = 4.....	- 65 -
Abbildung 32: Verteilung zytoplasmatische FANCI-Expression .....	- 66 -
Abbildung 33: Verteilung nukleäre FANCI-Expression .....	- 66 -
Abbildung 34: FANCI, 250-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv ohne Mutation, keine nukleäre Expression (IRS = 0) .....	- 67 -
Abbildung 35: FANCI, 250-fache Vergrößerung, Beispiel aus der Gruppe mit Mutation, IRS nukleär = 1, IRS zytoplasmatisch = 8.....	- 67 -
Abbildung 36: Verteilung nukleäre CtIp-Expression .....	- 68 -
Abbildung 37: Verteilung cytoplasmatische CtIp-Expression .....	- 68 -
Abbildung 38: CtIp, 400-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv mit Mutation, IRS nukleär = 1 .....	- 69 -
Abbildung 39: CtIp, 400-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv ohne Mutation, IRS nukleär = 4 .....	- 70 -
Abbildung 40: CtIp, 400-fache Vergrößerung, high- grade seröses Ovarialkarzinom, IRS zytoplasmatisch = 6, keine nukleäre Expression .....	- 72 -
Abbildung 41: CtIp, 400-fache Vergrößerung, high-grade seröses Ovarialkarzinom, IRS nukleär = 12 .....	- 73 -
Abbildung 42: Überlebensfunktion in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium.....	- 75 -
Abbildung 43: Überlebensfunktion in Abhängigkeit vom Grading .....	- 75 -
Abbildung 44: Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der CtIp-Expression (IRS) im Zytoplasma.....	- 76 -
Abbildung 45: Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der CtIp-Expression (PpZ) im Zytoplasma.....	- 76 -

Abbildung 46: Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der Ctlp-Expression (IRS)	
nukleär.....	- 77 -
Abbildung 47: Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der Ctlp-Expression (PpZ)	
nukleär.....	- 78 -

## 1 Einleitung

Das Ovarialkarzinom ist bis heute ein gynäkologischer Tumor, der unabhängig von seiner Morphologie und den verschiedenen Patientenprofilen einer Standardtherapie unterliegt. Eine zielgerichtete, personalisierte Therapie ist mit Einzug der PARP-Inhibitoren (Polyadenosin-5'-diphosphoribose-Polymerase) erstmals für das fortgeschrittene, seröse, high-grade Karzinom etabliert worden. Genetische Ursachen bei der Entstehung von Ovarialkarzinomen scheinen einen immer wichtiger werdenden Stellenwert einzunehmen und schaffen damit zum Teil die Möglichkeit, auf individuellere Therapieoptionen einzugehen und diese additiv zur Standardtherapie zu nutzen. Aktuell liegt der geschätzte Anteil an familiär bedingten Ovarialkarzinomen bei 5-10 %.

Neben der Mutation in den BRCA (Breast Cancer) Tumorsuppressorgenen 1 und 2 sind inzwischen weitere Gene identifiziert worden, die Einfluss auf die Karzinogenese beim Ovar nehmen. Hierzu zählen unter anderem Mutationen in den Genen MutS Homolog 6 (MSH6), RAD51 Paralog C (RAD51C) oder der Serin- Proteinkinase ATM (Krome 2018).

Die Standardmethode zur Abklärung des BRCA-Mutationsstatus ist die Next-Generation-Sequenzierung (NGS)-Analyse mit dem „TruRisk-Panel“ (Speiser et al. 2019). Dabei werden über 34 krebsrelevante Gene im Blut oder im Tumorgewebe untersucht. Komplettiert wird die Blutuntersuchung mit der Multiplex-Ligation-dependent-Probe-Amplification (MLPA) um durch die Existenz großer Duplikationen und Deletionen innerhalb der Gene die Gefahr des Nichterfassens einiger klinisch relevanter Mutationen zu umgehen. (Bauer et al. 2016).

Fällt die Keimbahntestung positiv aus, ist eine weitere Gewebetestung am Tumormaterial nicht sinnvoll. Andererseits ist bei einer negativen Gewebeprobe die Wahrscheinlichkeit einer Keimbahnmutation sehr gering.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob es immunhistochemisch möglich ist, mit diagnostisch relevanten molekularen Markern BRCA-Mutationen in Ovarialkarzinomen zu detektieren. Spezifisch ausgewählte Antikörper binden ihr nicht mutiertes Antigen (Protein) im gesunden Gewebe. Diese Antigen-Antikörper Reaktion wird durch Kopplung an ein Farbsystem sichtbar gemacht. Im Tumorgewebe ist diese Proteinexpression durch die Mutation verändert, was sich in einer Änderung des Farbumschlages bemerkbar machen könnte. Diese Unterschiede in der Expression des Proteins als auch in Bezug auf seine Lokalisation innerhalb der Zelle (cytoplasmatisch oder nukleär) könnten die Etablierung eines Screeningverfahrens hinsichtlich einer BRCA Mutation mithilfe spezifischer Antikörper ermöglichen. In dieser Arbeit soll

gezeigt werden, ob die hier untersuchten Marker HSPC142, BAP1, CtIp, FANCI und BAAT1 als therapeutische Targets beim high-grade serösen Ovarialkarzinom Eignung finden und auf weitere Tumorarten ausgeweitet werden können.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Das Ovarialkarzinom

#### 2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Ovarialkarzinoms

Das Ovarialkarzinom ist das dritthäufigste geschlechtsspezifische Genitalmalignom der Frau in der westlichen Welt (Blickenstorfer und Leeners 2017). In Deutschland ist das Ovarialkarzinom als zweithäufigster bösartiger Genitaltumor nach dem Endometriumkarzinom gelistet (Schmalfeldt und Seck 2013). Das Robert Koch Institut (RKI) berichtet mit Stand von 2014 von 7.250 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner in Deutschland. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt unabhängig von der histologischen Klassifikation bei 41%. Damit steht das Ovarialkarzinom hinter den Malignomen von Mamma, Kolon, Lunge, Gebärmutter, malignen Melanomen der Haut, der Bauchspeicheldrüse und dem Non-Hodgkin-Lymphom an achter Stelle der deutschlandweiten Neuerkrankungen der Frau (Robert Koch Institut 2017).



Abbildung 1: Inzidenz OVCA in Deutschland: Das Ovarialkarzinom ist verglichen mit allen Krebsarten das achthäufigste Malignom der Frau in Deutschland (Robert Koch Institut 2017)

Trotz sinkender Inzidenz sowie besserer Prognose in den letzten zwanzig Jahren bewegen sich die Mortalitätsraten in West- und Nordeuropa auf etwa konstantem Niveau. Große

Unterschiede zeigen sich in Inzidenz und Mortalität bezogen auf den Entwicklungsstand des Landes zu Lasten der „höher entwickelten“ Länder (Shimizu et al. 1998).

Erkrankungs- und Sterberaten nehmen in Deutschland seit der Jahrtausendwende ab, auch die Fallzahlen der Neuerkrankungen sind leicht rückläufig (Kaatsch et al. 2015).

Trotz dieser Zahlen hat das Ovarialkarzinom weiterhin eine schlechte Prognose, die durch fehlende Frühsymptome und eine bislang fehlende effektive Screeningmethode begründet ist (Schmalfeldt und Seck 2013; Gregorio 2018). Nahezu 75% aller Fälle werden im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (Dudenhausen 2002, S. 523).

Die Ätiologie der epithelialen Ovarialtumoren hat sich in den letzten Jahren stark gewandelt. Mögliche Ursprungsgewebe wie die Tube und deren genaue Pathogenese wurden vielfach diskutiert, waren jedoch lange schwer zu definieren, da direkte Vorläuferläsionen fehlten.

Fathalla stellte 1971 die Theorie auf, Ovarialkarzinome entstünden durch eine Entartung des ovariellen Deckepithels, welches durch Ovulationstraumata in das Stroma verschleppt werden und demnach durch entzündliche Prozesse genetische Defekte akkumulieren könnten (Ovulationshypothese). Eine andere Theorie ist die der erhöhten Gonadotropinausschüttung (Gonadotropin-Hypothese). Die Folgen einer exzessiven Stimulation des Ovars durch Gonadotropin sind epitheliale Proliferation und Zelltransformationsvorgänge, welche die Entstehung von entarteten Zellen unterstützen könnte (Wallwiener et al. 2017).

Inzwischen geht man davon aus, dass zumindest ein häufiger Ursprung epithelialer Ovarialtumoren außerhalb des Ovars, beispielsweise in der Tube zu suchen ist. Die Arbeit von Levanon et al. zeigte, dass der Ursprung des high-grade serösen Ovarialkarzinoms auf die Tubenepithelzelle zurückgehen könnte (Darb-Esfahani et al.; Levanon et al. 2010). Die Diskussion um mögliche Vorläuferläsionen, den serösen tubaren intraepithelialen Karzinomen (STIC) in der Entstehung des high-grade serösen Ovarialkarzinoms (HGSOVCA) hält bis heute an und benötigt zum Verfestigen der Vermutungen weitere Studien. STICS wurden ursprünglich in Tuben und Ovarien bei Frauen mit positivem BRCA-Status nach Salpingoophorektomien als p53 mutierte hochproliferative Läsionen entdeckt, später auch in weiter fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen nachgewiesen (Piek et al. 2001; Kurman und Shih 2011). Trotz den Gemeinsamkeiten zwischen STICS und HGSOVCA konnte bisher nicht geklärt werden, ob es sich bei den STICS in den weit fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen auch um Metastasen der Tubenschleimhaut handeln könnte (Sehdev et al. 2010; Taube et al. 2019).



Die fünf histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms unterscheiden sich in ihrer Morphologie, Pathogenese und Molekularbiologie (Taube et al. 2019). Daraus ergeben sich zusätzliche, individuelle Therapieansätze neben dem operativem Eingriff, welche die Prognose je nach histologischer Klassifikation beeinflussen können.

Als wichtigster prädiktiver Faktor für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms gilt die genetische Belastung. Neben den beiden wichtigsten Genen in der Entstehung von hereditärem Eierstockkrebs, dem Breast Cancer 1, early-onset (BRCA1) und Breast Cancer 2, early-onset (BRCA2) gibt es inzwischen eine Vielzahl anderer Gene, die in die Tumorentstehung bei Ovarien eingebunden sind, wie z.B. RAD51C&D und BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helicase 1 (BRIP) (Torre et al. 2018, Ramus et al. 2015).

Weitere Faktoren, die mit einem erhöhten Risiko einhergehen an Ovarialkrebs zu erkranken sind hohes Lebensalter, Infertilität, Adipositas, Hormonersatztherapie in der Peri- und Postmenopause, PCO-Syndrom, hohe Anzahl an Ovulationen, frühe Menarche oder spätes Klimakterium, Nulliparität, hereditäre Faktoren, Endometriose, Intrauterinpeessare (Lheureux et al. 2019). Protektiv hingegen wirken: Multiparität, Ovulationshemmer, Tubenligatur, Stillen sowie Progesteronsubstitution (Fehm et al. 2013).

### **2.1.2 Klassifikation des Ovarialkarzinoms**

Die World Health Organisation (WHO) teilt maligne Ovarialkarzinome nach dem Ursprung des Gewebes ein, aus dem sie hervorgehen. Den Großteil bildet die Gruppe der epithelialen Tumoren mit ca. 65-75%. Daneben gibt es die kleinere Gruppe der Keimstrang-Stromatumoren, Keimzelltumoren sowie Gruppen von seltenen Tumoren, wie z.B. den Brenner- und Borderline Tumor sowie klarzellige und undifferenzierte Ovarialkarzinome.

Unter den malignen Erkrankungen des Ovars ist das Ovarialkarzinom das häufigste. Der Großteil sind seröse Zystadenokarzinome (40-75%), gefolgt von muzinösen (10-20%) und endometroiden Adenokarzinomen (2-20%). Seltener sind die Subtypen der klarzelligen Karzinome (5%), der serös-muzinösen Karzinome, der unklassifizierten Karzinome sowie der malignen Brenner- Tumore (Blassl 2012, S. 253). Einen Überblick zeigt Tabelle Nr. 2.

Die verschiedenen histologischen Typen unterscheiden sich hinsichtlich der Epidemiologie sowie der Klinik. Nach Kurman werden ovarielle Neoplasien in Typ 1 und Typ 2 unterteilt (Kurman und Shih 2016).

Zu den Typ-1 Tumoren zählen überwiegend low-grade Karzinome mit klar abgrenzbaren Vorstufen, wenig invasivem Wachstum und kaum genetischer Genese. In diese Gruppe gehören low- grade seröse, endometrioid, muzinöse sowie klarzellige Karzinome. Letztere werden nicht graduiert, sondern generell als high-grade Karzinome angesehen. Die Typ-2 Gruppe umfasst high-grade seröse Tumore, welche oft mit einer BRCA-Mutation oder anderen chromosomalen Veränderungen einhergehen. Der Diagnosezeitpunkt ist oft spät, das Wachstum rasch progredient und die Prognose schlechter als bei Typ-1 Neoplasien (Wallwiener et al. 2017, S. 196 f.).

	Typ 1	Typ 2
Histologische Typen	„Low grade“ serös, muzinös, seromuzinös, „low grade“ endometrioid	„high grade“ serös „High grade“ endometrioid
Entstehungsmechanismus	Adenom> Borderline> Karzinom	De- novo Genese
Stadium bei Diagnose	Niedrig (meist 1)	Hoch (meist 3)
Prognose	Günstig	Schlecht
Molekulare Alterationen	KRAS-, BRAF-, PTEN- und PIK3CA-Mutationen, Mikrosatelliteninstabilität	TP53- Mutationen häufig

Tabelle 1: Einteilung der Ovarialkarzinome in Typ 1 und Typ 2 nach Kurman

Tumor	Subtyp	Charakteristika
<b>Epitheliale Tumore</b> (65-75%, ca. 90% der malignen Tumoren)	Zystadenom/ Zystadenokarzinom	- <i>serös papillär</i> : häufigster ovarieller Tumor, das häufigste und aggressivste Ovarialkarzinom, häufig bilateral - <i>muzinös</i> : zweithäufigster ovarieller Tumor, zu 75% benigne
	Endometrioides Zystadenom	Selten, benigne, oft Endometriose vorausgehend
	Endometrioides Karzinom	Seltener, Endometriose-assoziiert, in Teilen mit Endometriumkarzinom vergesellschaftet
	Sonderformen	Borderline Tumor: kaum invasiv, verstärkte Epithelproliferation und Zelltypen
	Seltene Formen	-Klazzelliges Karzinom -undifferenziertes Karzinom -Brenner- Tumor
<b>Keimzelltumoren</b> (15-25%)	Teratom	-adult/reif: • Dermoidzyste: häufigster aller Keimzelltumoren, meist benigne • Struma ovarii: mit entodermaler Differenzierung zu Schilddrüsengewebe, meist benigne -unreif: • Unreifes Teratom: selten und undifferenziert, hohes Entartungsrisiko
	Dysgerminom	Häufigster maligner Ovarialtumor bei jungen Frauen
	Dottersacktumor	Häufig maligne, oft im Kindes- und Jugendalter
	Nicht gestationales Chorionsarkom	Selten, sehr maligne
<b>Keimstrang- Stroma Tumoren</b> (5-10%)	Granulosazelltumor	Meist benigne
	Thekazelltumor	Häufig Östrogen-produzierend
	Androblastom	Produziert Androgene
<b>Mesenchymale Tumoren</b> (4%)	Malignes Fibrosarkom	Sehr selten, maligne
	Ovarialfibrom	benigne
<b>Metastasen</b> (10-15%)		Krukenberg Tumor: meist beidseitige Ovarialmetastase eines undifferenzierten Magenkarzinoms

Tabelle 2: Histologische Einteilung ovarieller Neoplasien

### 2.1.3 Grading des Ovarialkarzinoms

Es existieren verschiedene Graduierungssysteme für Ovarialkarzinome. Ein allgemeingültiges für alle histologischen Typen zu etablieren gestaltet sich bis heute schwierig. Shimizu et al hat 1998 als Mitbegründer ein Grading von Ovarialkarzinomen vorgestellt. Hierbei gilt, dass je niedriger das Grading, desto höher differenziert sind die Tumorzellen. Silverberg vergab Punkte ab einem Grading von G1 bis G3 (Silverberg 2000).

Hierbei werden jeweils Architektur, Kernpleomorphologie und Mitosezahl der Zellen unterschieden. Maximal zu erreichende Punktzahl ist 9. Zur Bestimmung des Gratings werden in den Kategorien 1-3 Punkte vergeben, welche summiert den Gesamtscore des Differenzierungsgrades bilden. Die Gruppe „gut differenziert“ setzt sich aus 3-5 Punkten

und Grad 2 zusammen, die Gruppe “mäßig differenziert“ aus den Punkten 6-7 und Grad 2 und die Gruppe „schlecht differenziert“ aus 8-9 Punkten und Grad 3.

<b>Punktwerte</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Architektur</b>	glandulär	papillär	solide
<b>Kernpleo-morphologie</b>	Relativ uniforme vesikuläre Kerne, Kerngrößenvariation <2:1, keine prominenten Nukleolen	Kerngrößenvariation zwischen 2:1 und 4:1, kleine Nukleolen, keine bizarren Kerne	Kerngrößenvariablen 4:1, große eosinophile Nukleolen, evtl. bizarre Kerne
<b>Mitosezahl</b>			
<b>Sehfeldzahl 20</b>	0-7	8-18	>19
<b>Sehfeldzahl 26</b>	8-18	10-24	>25

Tabelle 3: Grading nach Silverberg

Diese Einteilung von Shimizu und Silberberg kann für alle Karzinomtypen einheitlich verwendet werden. Allerdings gelingt für die G2 Tumoren, die den Großteil darstellen, mit diesem System keine Abschätzung der Prognose. Daneben existiert ein weiteres Grading System von Malpica und Silva, welches speziell für seröse Karzinome Relevanz hat (serös low-grade und serös high-grade Karzinome). Dieses System ist im Gegensatz zu dem etablierten von Silverberg zweistufig (Malpica et al. 2004).

Bisher wurde in den USA zum Grading das System der Gynecologic Oncology Group (GOG) herangezogen, während in Deutschland eher nach FIGO, WHO und Silverberg graduiert wurde. Für die serösen Karzinome wird die Einteilung nach Malpica verwendet (low grade serös und high grade serös), wobei die Einteilung sich am nukleären Atypiegrad sowie der Mitosezahl/10 HPF orientiert.

Aktuell werden die restlichen histologischen Subtypen laut AGO wie folgt graduiert: Klarzellige Karzinome sowie undifferenzierte Karzinome gelten als high grade, muzine Karzinome sowie maligne Brenner-Tumore erhalten keinen Differenzierungsgrad. Endometrioide Karzinome werden analog den endometrioiden Karzinomen des Endometriums graduiert.

	<b>Kernatypiegrad</b>	<b>Mitosen/10 HPF</b>
<b>Serös low-grade Karzinome</b>	Gering bis mittel, <3 fache Größenvarianz,	$\leq 12$
<b>Serös high-grade Karzinome</b>	$\geq 3$ -fache Größenvarianten	$>12$

Tabelle 4: Graduierungssystem nach Malpica und Silva (Hauptmann et al. 2014)

#### 2.1.4 Erbliche Formen des Ovarialkarzinoms

Während ca. 95% der Ovarialkarzinome sporadisch auftreten, lässt sich bei 5-10 % eine genetische Vorbelastung feststellen. Die betroffenen Frauen weisen in diesen Fällen eine positive Familienanamnese auf (Lax 2017). So verändert sich das Lebenszeitrisko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken mit genetischer Disposition von 1,6 % auf bis zu 5%, wenn ein Verwandter ersten Grades betroffen ist. In der Allgemeinbevölkerung tritt eine BRCA-Mutation in ca 0,3% der Fälle auf, die Prävalenz der Allgemeinbevölkerung für pathogene BRCA-Keimbahnmutationen wird bei 1:400- 1:800 angegeben (Moog und Rieß 2014).

Treten in der Familie mehrere Fälle mit Ovarialkarzinom auf (mindestens zwei Verwandte ersten Grades) ist per definitionem von einem hereditären Ovarialkarzinom auszugehen (Pfisterer und Du Bois 2002).

Es gibt verschiedene Gene die zu erblich bedingtem Eierstockkrebs führen. Die häufigsten sind Keimbahnmutationen in den Tumorsuppressorgenen BRCA1 und BRCA2. Sie sind verantwortlich für 65- 85% aller erblich bedingten Ovarialkarzinome. Laut dem deutschen Konsortium für familiären Brust- und Eierstockkrebs beträgt das kumulative Karzinomerkrankungsrisiko mit einer Mutation in den BRCA-Genen an einem Ovarialkarzinom zu erkranken für BRCA1 bis zu 40% und für BRCA2 zwischen 10-20% (Kanzow et al. 2018).

Neben somatischen- und keimbahnassoziierten Mutationen in den BRCA-Genen gibt es inzwischen einige weitere Gene, die bei Mutation mit einem erhöhten Risiko einhergehen, ein Ovarialkarzinom zu entwickeln. Zu diesen high-risk Genen („core genes“) zählen aktuell die folgenden: ATM, BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, NBN, PALB2, RAD51C, RAD51D und TP53 (Schmutzler 2017).

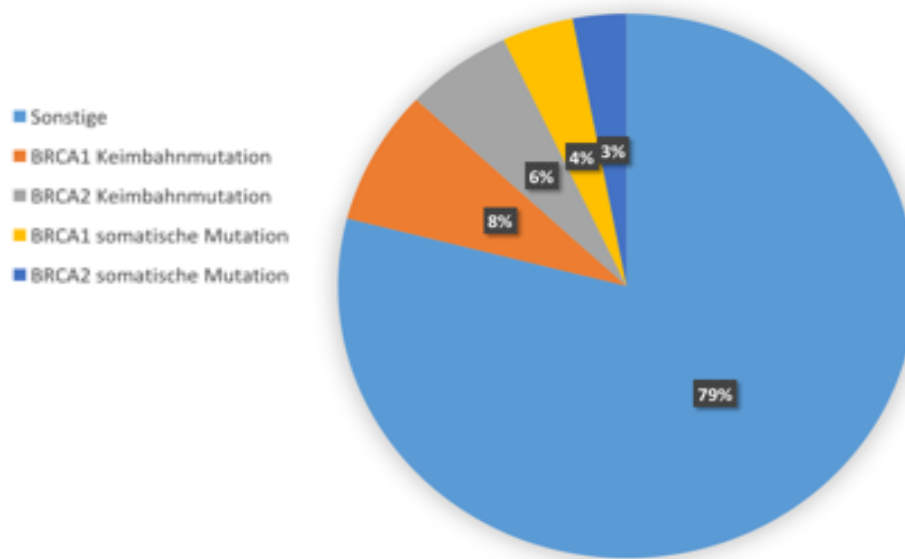


Abbildung 2: Anteil somatischer und keimbahnmutierter BRCA-Mutationen modifiziert nach (Integrated Genomic Analyses of Ovarian Carcinoma 2011)

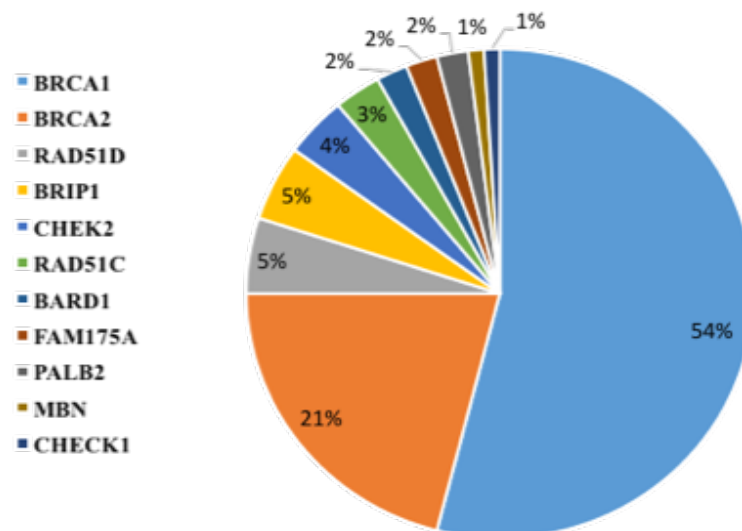


Abbildung 3: Anteil verschiedener high risk und low risk Gene an der Entstehung von hereditärem Eierstockkrebs (Pennington et al. 2014)

### 2.1.5 Klinik und Symptome

Das Ovarialkarzinom ist eine gynäkologische Neoplasie, bei der Symptome sehr spät auftreten und zunächst meist unspezifisch sind. Eine Begründung dafür ist, dass Ovarien

im Bauchraum relativ frei beweglich sind und somit zunächst keine angrenzenden Strukturen komprimieren können. Erst ab FIGO Stadium 3, wenn der Tumor sich über das Becken peritoneal ausbreitet, kann es zu abdominellen Beschwerden mit Völlegefühl, Aszites und einer ungewollten Zunahme des Bauchumfanges kommen, weshalb die meisten Diagnosen erst in diesem Stadium gestellt werden (Ebell et al. 2016). Des Weiteren werden Symptome wie Meteorismus, Völlegefühl oder Obstipation oft anderen häufigen Erkrankungen, wie dem Reizdarmsyndrom, zugeschrieben (Sailer 2016; Petru et al. 2017). Aus diesen Gründen sollten diese Symptome, sofern sie dauerhaft auftreten und keiner anderen Grunderkrankung zugeschrieben werden können, bei Frauen ab 50 Jahren dringend abgeklärt werden.

### **2.1.6 Diagnostik und Staging**

Bisher gibt es keine anerkannte Screeningmethode. Neben der standardisierten gynäkologischen Tastuntersuchung kann zum Darstellen von ovariellen Raumforderungen ein transvaginaler Ultraschall durchgeführt werden. Da zystische Anteile mit Mehrkammerung und schlechter Randbegrenzung oft nicht klar von einer malignen Raumforderung abgegrenzt werden können, müssen diese vorerst als suspekt eingestuft werden. Sicher als malignitätsverdächtig einzustufen sind papilläre Anteile innerhalb zystischer Raumforderungen, Septierungen, Binnenechos und Aszites. Die von drei Medizinerinnen 1999 gegründete International Ovarian Tumor Analysis Gruppe (IOTA) versucht seitdem eine „Anleitung“, gezielte sonografische Merkmale, zu erstellen, anhand der es möglich werden soll, benigne von malignen Raumforderungen präoperativ unterscheiden zu können. Die in diesem Zuge erarbeiteten Simple Rules beinhalten 5 M-Merkmale und 5 B-Merkmale. M-Merkmale sprechen für Malignität, B-Merkmale für Benignität. Zu den M-Merkmalen gehören ein unregelmäßiger solider Tumor, Aszites, mindestens 4 papilläre Strukturen, unregelmäßiger multilokulärer-solider Tumor sowie ein sehr hoher Farbanteil in der Farb-Doppler-Untersuchung. Zu den B-Merkmalen zählen unilokuläre Zysten, solide Tumorkomponenten, Schallschatten, glatte multilokuläre Tumoren und kein Blutfluss bei der Doppler-Untersuchung (Timmerman et al. 2016).

<b>M-Features – sonographische Kriterien für Malignität</b>	<b>B-Features – sonographische Kriterien für Benignität</b>
M1: irregulär-solider Tumor	B1: unilokulär
M2: Aszites nachweisbar	B2: solide Anteile kleiner als 7 mm
M3: >4 papilläre Strukturen	B3: Schallschatten nachweisbar
M4: irregulärer multilokulär-solider Tumor mit >10 cm größter Durchmesser	B4: weicher multilokulärer Tumor mit <10 cm größter Durchmesser
M5: sehr starke Blutfluss	B5: kein Blutfluss nachweisbar
Mindestens ein M-Feature bei keinem B-Feature: Klassifikation als maligne	
Mindestens ein B-Feature bei keinem M-Feature: Klassifikation als benigne	
Wenn B- und M-Features nachweisbar oder weder B- noch M-Feature nachweisbar: weiterführende Untersuchung z. B. durch erfahrenen Untersucher	

Tabelle 5: IOTA Kriterien zur Dignitätseinschätzung von Adnexläsionen („simple rules“) (Timmerman et al. 2010)

Bei Verdacht auf abdominelle Raumforderungen mit Aszites und Beteiligung des Peritoneums eignet sich ein abdominaler Ultraschall sowie eine weitere Abklärung durch eine Computertomographie (Kanzow et al. 2018). Aufschluss über eine familiäre Belastung gibt eine gründlich erhobene Familienanamnese. Der Tumormarker Cancer-Antigen 125 (CA-125) besitzt zu geringe diagnostische Sensitivität und kann auch bei gutartigen Erkrankungen wie Myomen oder Leberzirrhose erhöht sein (Devarbhavi et al. 2002; Mahner et al. 2009). Daher sollte er in der Primärdiagnostik nicht zur generellen Vorsorge empfohlen werden (Zulauf et al. 2019).

Das Tumorstaging erfolgt anhand von zwei Klassifikationssystemen: Die TNM Klassifikation richtet sich nach klinisch-pathologischen Befunden, die intraoperativ erhobenen makroskopischen Befunde richten sich nach der Einteilung der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique Klassifikation (FIGO).

Die FIGO-Einteilung wurde von der International Union against Cancer (UICC) für das TNM-System größtenteils übernommen. Die Aktualisierung der TNM-Stadien nach UICC erschienen 2017 (Wittekind 2017). Tabelle 3 zeigt eine aktuelle Aufführung von TNM und FIGO-Stadien aus der aktuellen (Januar 2019) S3 Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie (AGO) (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe 2019).



<b>TNM</b>	<b>FIGO</b>	<b>Erklärung</b>
<b>Tx</b>		Primärtumor nicht bekannt, keine Angabe
<b>T0</b>		Kein Anhalt für einen Tumor
<b>T1</b>	I	Tumor auf Ovarien/Tuben beschränkt
<b>T1a</b>	IA	Auf ein Ovar (Kapsel intakt) oder eine Tube (Serosa intakt) beschränkt, negative Spülzytologie
<b>T1b</b>	IB	Befall beider Ovarien (Kapsel intakt) oder beider Tuben (Serosa intakt), negative Spülzytologie
<b>T1c</b>	IC	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit Nachweis einer der folgenden Punkte:
<b>T1c1</b>	IC1	Iatrogene Kapsel- (Serosa-) ruptur
<b>T1c2</b>	IC2	Präoperative Kapsel-(Serosa-) ruptur oder Tumor auf der Ovar- oder Tubenoberfläche
<b>T1c3</b>	IC3	Maligne Zellen im Ascites oder in der Spülzytologie nachweisbar
<b>T2</b>	II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
<b>T2a</b>	Ila	Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben und/oder Ovarien
<b>T2b</b>	IIB	Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens
<b>T3 und/oder N1</b>	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphnotenmetastasen
<b>T3</b>		Nur retroperitoneale Lymphknotenmetastasen

<b>N1a</b>	IIIA1i	Metastasen < 10mm
<b>N1b</b>	IIIAii	Metastasen > 10mm
<b>T3a jedes N</b>	IIIA2	Mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastase
<b>T3B jedes N</b>	IIIB	Makroskopisch extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens <2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
<b>T3c jedes N</b>	IIIC	Makroskopisch extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens >2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen, schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und/oder die Milzkapsel ein
<b>M1</b>	IV	Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen
<b>M1a</b>	IVA	Pleuraerguß mit positiver Zytologie
<b>M1b</b>	IVB	Parenchymale Metastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen in außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und /oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

Tabelle 6: aktuelle TMN Klassifikation des Leitlinienprogramms Onkologie, S3 Leitlinie Ovarialkarzinom, Kurzversion, Januar 2019

### **2.1.7 Therapie**

Die Therapie eines Ovarialkarzinoms setzt sich zusammen aus operativen Maßnahmen und einer systemischen (Chemo-) Therapie. Ergänzend kommen zielgerichtete Therapien vermehrt zum Einsatz. Über hormonelle Präparate wie in der Behandlung des Mammakarzinoms wird aktuell diskutiert, bisher gibt es in der Leitlinie allerdings keine Empfehlung.

#### ***Operative Therapie***

Die operative Therapie dient neben der Diagnostik und des Stagings auch der Prognoseverbesserung. Das primär operative Debulking, was zunächst bei jeder Diagnosestellung eines fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms durchgeführt wird kann in Einzelfällen durch eine spätere Intervall-Operation ersetzt werden. Hierzu muss allerdings eine klare Indikation vorliegen (Sehouli und Höffken 2019).

Die radikale Staging-OP besteht aus einer Längsschnittlaparatomie mit der Entfernung von der Gebärmutter und den Adnexen (Hysterektomie mit Adnexektomie), Entfernung der Lymphknotenpakete paraaortal und pelvin sowie der Entfernung des großen Netzes (Omentum majus). Zusätzlich sollte bei Befall eine Appendektomie erfolgen und neben einer Peritonealzytologie eine Resektion aller befallener Peritoneumanteile mit Biopsieentnahme erfolgen. Auch bei fortgeschrittenem Karzinom (FIGO 2b-4) sollte eine R0-Resektion angestrebt werden (Fehm et al. 2013). Von karzinomverdächtigen Stellen sollten Biopsien genommen werden. Laut aktueller S3 Leitlinie ist bei Vorliegen eines FIGO Stadiums 1a /G1 bei Frauen vor der Menopause eine fertilitätserhaltende Operation indiziert, bei der nur das betroffene Ovar sowie die gleichseitige Tube entfernt werden. Die Patientin muss umfassend über die Risiken einer fertilitätserhaltenden Operation in Abhängigkeit der Prognosefaktoren aufgeklärt werden. Zudem sind engmaschige Nachkontrollen indiziert.

Bei karzinomnegativen Schnellschnitt ist ein Ausschälen des Tumors möglich sowie die Entfernung der Adnexe.

#### ***Medikamentöse Therapie:***

Bei der medikamentösen Behandlung des Ovarialkarzinoms hat sich das Spektrum an Möglichkeiten in den letzten Jahren massiv erweitert. Neben der klassischen (systemischen) Chemotherapie haben inzwischen auch zielgerichtete Therapien Einzug in die Therapie des Ovarialkarzinoms gewonnen. Spezifische PARP-Inhibitoren bei nachgewiesener BRCA Mutation werden im Kapitel 2.2.4 behandelt. Bei der

Chemotherapie unterscheidet man die systemische Primärtherapie, die adjuvante Therapie, die rein kurative und die palliative Therapie jeweils abhängig vom Fortschritt der Erkrankung. Grundsätzlich sollte nach den aktuellen Leitlinien zur Behandlung eines fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms (IIb-IV) eine adjuvante Carboplatin enthaltende Polychemotherapie in Kombination mit einem Mitosehemmstoff (z.B. Paclitaxel) angestrebt werden. Das aktuelle Schema beinhaltet Carboplatin AUC5 und Paclitaxel über 3 Stunden i.v. alle drei Wochen für sechs Zyklen (Borges und Schmalfeldt 2011; Fehm et al. 2013).

Die primär systemische Therapie des frühen Ovarialkarzinoms ist abhängig vom FIGO Stadium und vom Grading. Im Stadium FIGO I/G1 soll nach operativem Staging keine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden. Im Stadium IC oder IA/B und G3 soll ebenfalls die adjuvante Carboplatin-haltige Chemotherapie angeboten werden. Eine „Kann“-Indikation stellen laut Leitlinie die Stadien IA/G2 und IB/G1+2 dar (Marmé et al. 2019).

Durch Anwendung der Kombinationstherapie bestehend aus Operation und adjuvanter Chemotherapie kann bei den meisten Patientinnen zumindest temporär Tumorfreiheit erreicht werden. Allerdings bleibt die Rezidivrate vor allem in höheren FIGO Stadien weiterhin hoch und in der Regel sind diese Patientinnen nicht mehr heilbar. Einer der wichtigsten Prognosefaktoren ist hierbei der Zeitraum zwischen letztem Chemotherapie-Zyklus und der Diagnosestellung des Rezidivs (Zivanovic und Oseledchyk 2018).

Die Definition des Rezidivs unterlag jüngst einem Wandel: Vom „Platin-resistenten Rezidiv“ und „Platin-sensiblen“ Rezidiv und deren scharfer Trennung hat man heute Abstand genommen. Die neue Nomenklatur definiert ein Platin-resistentes Rezidiv, wenn die erneute Platin-haltige Therapie keine Option ist. Dementsprechend wird beim ehemals Platin-sensiblen Rezidiv nun von einer Rezidivtherapie basierend auf einer erneuten Platin-haltigen Therapie gesprochen. Daher finden die Begriffe „Platin-geeignet“ und „Platin-ungeeignet“ vermehrt Anwendung.

Ein therapiefreies Intervall von über sechs Monaten vor einem Rezidiv ist dementsprechend Platin-geeignet und kann mit einer Re-Induktionstherapie behandelt werden. Hierbei kommt eine Kombinationschemotherapie aus Carboplatin mit wahlweise Gemcitabin, Paclitaxel oder Doxorubicin infrage. Das mediane Überleben beträgt hierbei 36- 48 Monate (Chi et al. 2006).

Bei Platin-ungeeignetem Rezidiv ist eine alternative Monotherapie mit Topotecan oder Anthrazyklinen möglich. In den aktuellen Leitlinien wird von der Hormontherapie eines

Ovarialkarzinoms mit GNRH-Analoga, Gestagenen und Tamoxifen abgeraten. Die Anwendung des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Inhibitors Bevacizumab kann bei beiden Rezidivarten Anwendung finden.

Die operative Rezidivtherapie ist Teil aktueller Studien und kann aktuell nicht generell empfohlen werden. Auch von einer hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie (HIPEC) wird in den Leitlinien zum aktuellen Zeitpunkt abgeraten.

Eine Strahlentherapie wurde in der Vergangenheit als Abdomenbestrahlung eingesetzt. Nachteil dieser Methode war die nachhaltige Schädigung des Darms und eine damit verbundene erhöhte Morbidität, weshalb dieses Verfahren wieder verlassen wurde (Kuhn und Keyver-Paik 2019). Ergebnisse einer aktuellen Studie von Chundury et al. zu einem modifizierten Bestrahlungskonzept im Sinne einer intensitätsmodulierten Radio-Therapie (IMRT) stehen noch aus (Chundury et al. 2016).

Aktuell umstritten ist nach wie vor eine neoadjuvante Chemotherapie, auch wenn die aktuelle Leitlinie eine NACT (Neoadjuvante Chemotherapie) nicht empfiehlt. Laut von Kieseritzky et al zeigen aufbauend auf einer randomisierten klinischen Studie von 2010, welche OVCA-Patientinnen im Stadium IIIC und IV eine NACT erhielten und im Vergleich zur primär zytoreduktiven Therapie in Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben dieser nicht unterlegen waren, dass nachfolgende Studien kontroverse Ergebnisse erbrachten. So auch in einer amerikanischen Studie aufbauend auf Daten des National Comprehensive Cancer Center Network (NCCN) in denen das Ergebnis einer neoadjuvanten Chemotherapie mit dem einer zytoreduktiven Operation verglichen wurde. Fazit war, dass die NACT im Stadium III und IV deutlich häufiger zur Anwendung kam, im Stadium III C die zytoreduktive Operation mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert war (Kieseritzky et al. 2017).

Die große internationale Phase II Studie der EORTC-GCG/ NCIC –CTG von 2010 erbrachte bestätigte Zweifler der NACT: Es wurden 670 Patienten mit fortgeschrittenem OVCA, Tuben- oder Peritonealkarzinom so randomisiert, dass die eine Gruppe nach operativem Debulking sechs Zyklen platinhaltige Chemotherapie bekam oder (experimentelle Gruppe) neoadjuvante platinhaltige Chemotherapie über sechs Wochen und Intervall-OP nach drei Wochen erhielt. Ziel war der Nachweis der Nicht-Unterlegenheit der NACT. Kritik gab es am Festlegen des optimalen Operationszeitpunktes und der Qualität der Intervall-Operationen. Beides war nicht in allen Fällen einheitlich und somit schlecht vergleichbar. Deshalb blieb die AGO bei der

Empfehlung die NACT nicht standardmäßig in das Behandlungskonzept mit aufzunehmen.

Ein relativ neuer Therapieansatz ist der Einsatz von so genannten „targeted therapies“, personalisierten, zielgerichteten Therapien. Analog zu anderen Tumoren wie dem Mamma- Nieren, Darm, Brust-oder Bronchialkarzinom hat der VEGF-Inhibitor (vaascular endothelial growth factor) Bevacizumab die Zulassung zur Anwendung beim Ovarialkarzinom ab FIGO Stadium IIIB. Bevacizumab kann additiv in der Dosierung 15 mg/kg zur Chemotherapie verabreicht werden sowie als Erhaltungstherapie über 15 Monate weiter Anwendung finden (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe 2019).

Die Zulassung 2011 basiert auf den beiden Phase III Studien GOG 218 und ICON7, welche beide einen Überlebensvorteil durch das Hinzunehmen von Bevacizumab konstatieren konnten. Allerdings profitieren nur Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens von einer additiven Bevacizumab-Therapie (Seck und Schmalfeldt 2016). Neben dem erfolgreichen Einsatz von Bevacizumab sind ständig andere Immunmodulatoren untersucht worden, von denen bisher aber keiner vielversprechende Ergebnisse erzielte. Die Tyrosinkinaseinhibitoren Pazopanib und Nintedanib konnten ihren hohen klinischen Erwartungen nicht gerecht werden und treten mit einem erheblichen Nebenwirkungsprofil bei Anwendung in Erscheinung.

Der Ant-PD-L1 Antikörper Avelumab befindet sich aktuell in klinischer Prüfung. Er soll in der Lage sein, eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität auszulösen (Aivazova-Fuchs und Friese 2017).

Abschließend gäbe es noch die Option einer endokrinen Therapie ähnlich wie beim Mammakarzinom. Hierzu kämen Tamoxifen, Aromatasehemmer und GnRH-Analoga in Betracht. Trotz wenig toxischer Nebenwirkungen ist die Datenlage für eine generelle Empfehlung zu gering, es fehlen groß angelegte Phase III Studien (Engel und Ortmann 2012).

### **2.1.8 Prognose und Prävention**

Die Prognose des Ovarialkarzinoms ist abhängig vom FIGO-Stadium, dem histologischen Subtyp, dem Grading und dem postoperativem Tumorrest (Borges und Schmalfeldt 2011; Du Bois et al. 2009). Patientinnen mit FIGO-Stadium I haben eine 80-90 prozentige 5-Jahres-Überlebensrate. Bei den FIGO-Stadien II und III ist ein 5-Jahres-Überleben nur noch in 40-70% bzw. 4-15% zu erreichen (Kanzow et al. 2018).

Prognostisch ungünstig sind zudem ein hohes Alter mit schlechtem Allgemeinzustand und hoher Komorbidität.

Als präventive Maßnahme zum frühzeitigen Entdecken eines Ovarialkarzinoms stellt die jährliche gynäkologische Routineuntersuchung inklusive einer ausführlichen Anamnese und einem vaginalen Ultraschall aktuell immer noch die wichtigste Vorsorgemaßnahme dar. Ein Screening zur Früherkennung eines Ovarialkarzinoms existiert nicht (Schmalfeldt und Seck). Deswegen ist jedem Hinweis in der Anamnese auf eine familiäre Vorbelastung hinsichtlich gynäkologischer Tumoren explizit nachzugehen.

Die Spezifität des Tumormarker CA-125 ist gering, daher sollte er wie oben beschrieben weder in der Primärdiagnostik eines Ovarialkarzinoms noch als präventiver Marker Anwendung finden.

## 2.2 BRCA Gene 1 und 2

### 2.2.1 Genlokalisierung und Aufbau

Die Abkürzung BRCA steht für BReast CAncer. Bei den beiden BRCA-Genen handelt es sich um zwei verschiedene (Tumorsuppressor-)Gene, deren Proteine im Zellkern eines jeden Menschen vorkommen. Das BRCA1-Gen wurde durch den US-Amerikaner J.M. Hall 1990 auf Chromosom 17 q21 entdeckt. Es besteht aus 24 Exons und kodiert ein Protein aus 1863 Aminosäuren mit einem Gewicht von 200 kD (Xu und Solomon 1996). Es folgte die Entdeckung des BRCA2 Gens auf Chromosom 13, Genlocus q12-13 im Jahr 1994. Das BRCA2-Gen besteht aus 27 codierenden Exons, codiert ein Protein aus 3418 Aminosäuren und hat ein Gewicht von 384 kDa (Bertwistle und Ashworth 1998).

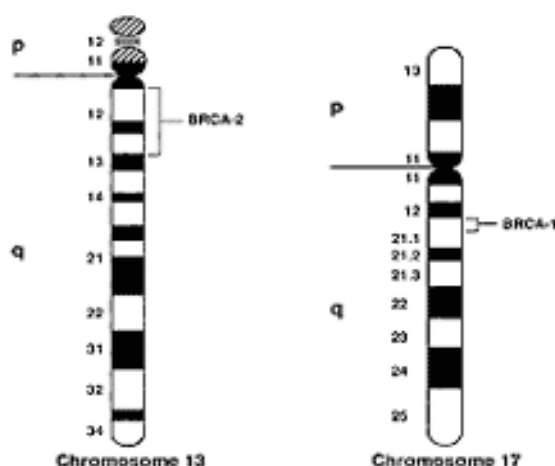


Abbildung 4: Lokalisierung der BRCA-Gene auf ihren jeweiligen Chromosomen (Bolton et al. 2012)

## 2.2.2 Funktion der BRCA1 und BRCA2 Gene sowie deren Proteine

### BRCA1

Bei den beiden BRCA-Genen handelt es sich um Tumorsuppressorgene. Die von ihnen codierten Proteine sind kernständig und komplex am Prozess der Zellregulierung beteiligt. Für BRCA1 sind multifunktionelle Funktionen wie Ubiquitinierung von Proteinen, Zellzyklusregulierung, DNA-Doppelstrangreparatur durch homologe Rekombination, transkriptionale Regulation, Chromatin Remodelling und RNA splicing nachgewiesen (Paul und Paul 2014).

BRCA1 besitzt mehrere unterschiedliche Proteindomänen (siehe Abbildung 5), mit welchen es über verschiedene andere Proteine Komplexe bilden oder mit diesen interagieren kann. Die zinkbindende Ringfingerdomäne (RING=really interesting new gene) ist nahe des NH2 Terminus lokalisiert. Welch et. al beschrieb diesen Genabschnitt wie folgend:

„RING fingers are zinc-binding domains defined by a conserved pattern of cysteines and histidines that mediate protein-protein or protein- DNA interactions“  
(Welch et al. 2000).

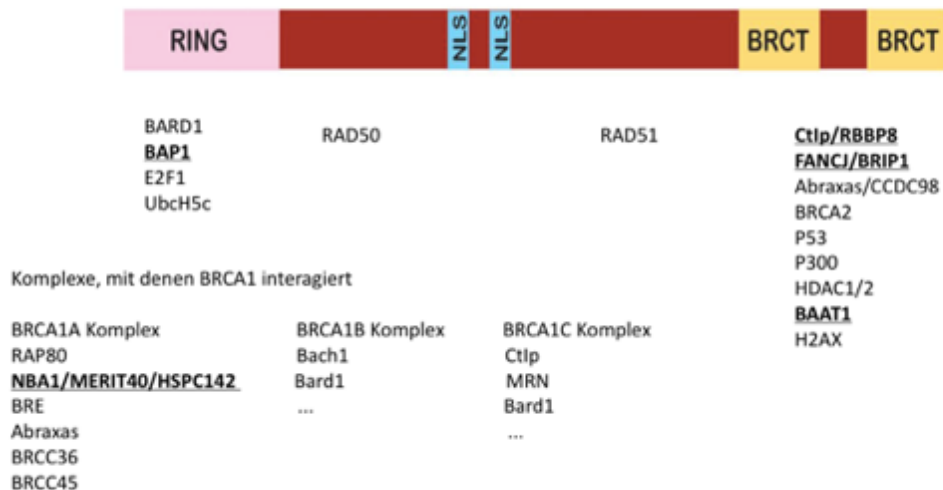


Abbildung 5: Schematische Darstellung des BRCA1 Gens.

In dieser Arbeit untersuchte Proteine sind unterstrichen und hervorgehoben. Modifiziert nach (Yun und Hiom 2009)



Eine Funktion von BRCA1 ist die Ubiquitinierung anderer Proteine. Dieser Prozess, bei dem es sich um eine posttranslationale Modifizierung handelt, kann in Form einer Mono- oder Polyubiquitinierung ablaufen. Bei der Monoubiquitinierung werden diese anderen Proteine in ihrer Funktion verändert oder durch Polyubiquitinierung markiert und für den Abbau durch Proteasom zugänglich gemacht (Heine und Parvin 2007). Die RING Domäne von BRCA1 besitzt Ubiquitin E3 Ligase-Aktivität und kann andere Proteine ubiquitinieren (Wu et al. 2010).

Der Ablauf der beteiligten Enzyme ist immer gleich und besteht aus drei Faktoren: einem Ubiquitin aktivierendem Enzym (E1), einem Ubiquitin conjugierendem Enzym (E2) sowie einer Ubiquitin- Ligase (E3). Die RING-Finger-Domäne E3 ist verfügt im Gegensatz zu anderen Ubiquitin Ligasen nicht über eine enzymatische Aktivität per se. Dafür ist sie in der Lage das Protein, welches ubiquitiniert werden soll, mit E2 zusammen zu bringen. Ohne die Hilfe der Ubiquitin Ligase kann E2 das zu ubiquitinierende Protein nicht erkennen (Panier und Durocher 2009).

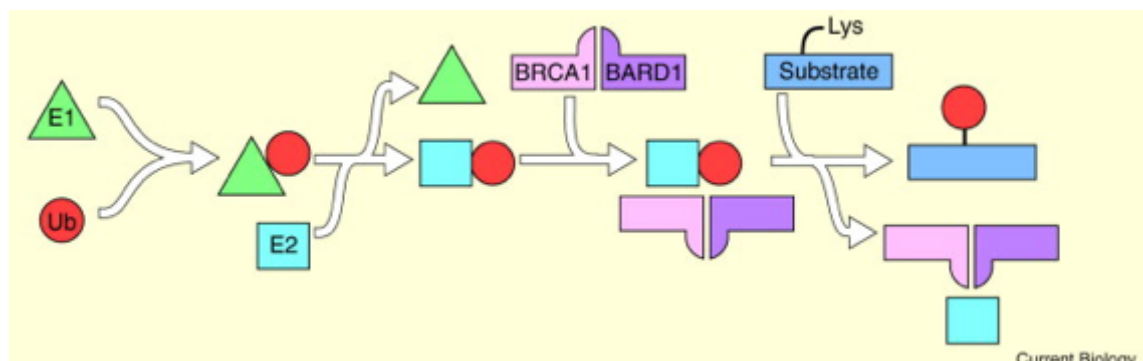


Abbildung 6: Schematische Darstellung des BRCA1/BARD1 Komplexes und der Ubiquitin aktivierenden Enzyme (Kerr und Ashworth 2001)

Mit Hilfe der Ubiquitin konjugierenden Enzyme wird die RING-Finger Domäne von BRCA1 in vitro ubiquitiniert, in Zellen findet man sie oft an DNA Strangbrüchen, welche mit Chromatin assoziiert sind. Der BRCA1-BARD1 Komplex fungiert zusammen als E3 Ubiquitin-Ligase und ist für die Tumorsuppressoraktivität von BRCA1 mitverantwortlich. Eine Mutation in der BRCA1 Ring-Domäne kann dazu führen, dass BRCA1 associated ring domain 1 protein (BARD1) von BRCA1 abgespalten wird und die damit einhergehende verminderte E3 Ligase-Aktivität die Entstehung von Karzinomen begünstigt. Beispiel hierfür stellt die die BRCA1 RING (C61G) Mutation dar, welche zu einer der häufigsten Missense Mutationen im BRCA1-Gen führt.

Daraus ergibt sich, dass Mutationen in diesem Bereich der RING Domäne zu Karzinomentwicklung führen könnten und hier der Zusammenhang zwischen der Ubiquitinierungs- und der Tumorsuppressorfunktion von BRCA liegt (Hashizume et al. 2001; Drost et al. 2011; Takaoka und Miki 2018).

Neben der Funktion der RING-Finger Domäne als Ubiquitin-Ligase ist sie neben BARD1 auch Bindungsstelle für BRCA1 associated protein (BAP1). BRCA1 bindet an BARD1 in vivo und ist so ein stabiler, heterodimerer Komplex (Baer 2002; Wu et al. 2010). Dieser Komplex BRCA1/BARD1 ist zentral in das Geschehen der DNA-Reparatur involviert. Einzeln sind beide RING Domänen Proteine, zusammen haben sie E3 Ligase Aktivität die für das Anhäufen von Ubiquitin Konjugaten an „DNA damage sites“ verantwortlich sind (Kalb et al. 2014).

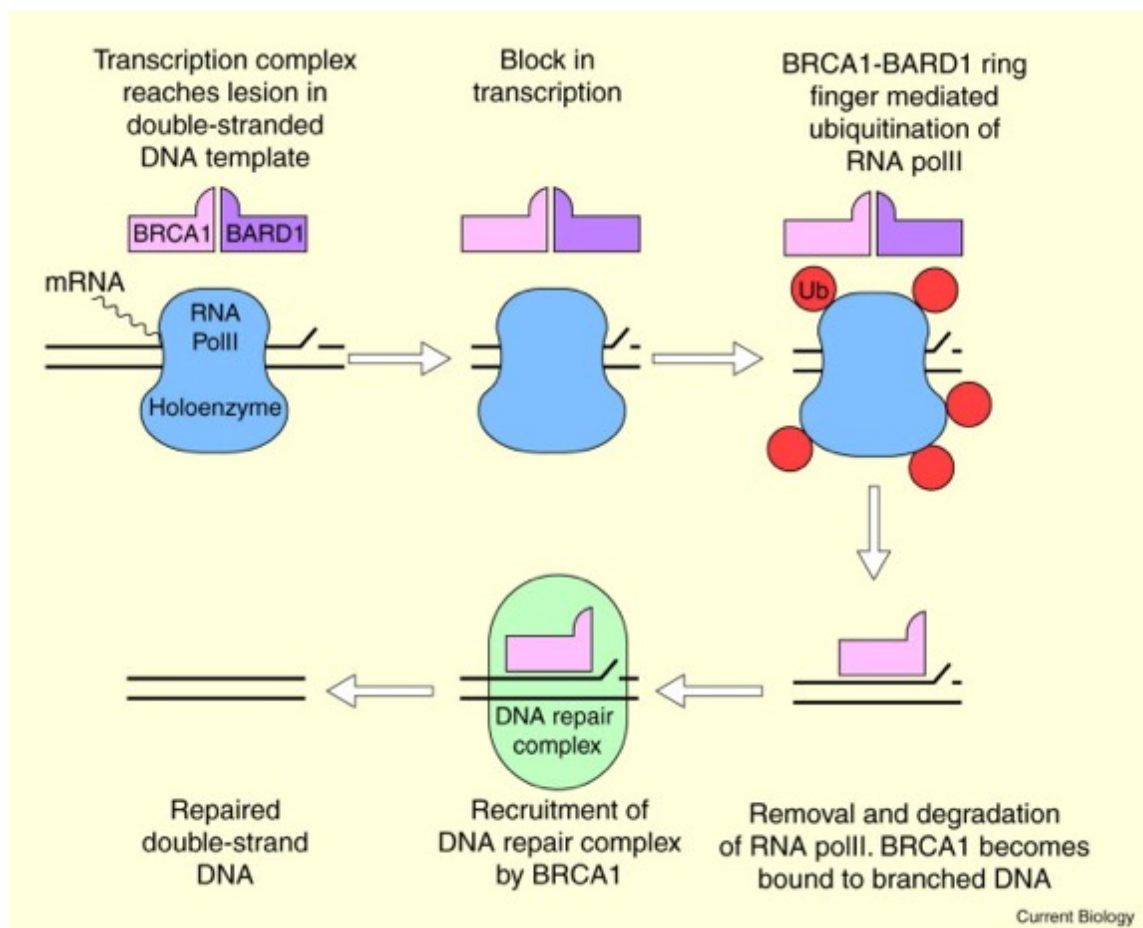


Abbildung 7: Rolle des BRCA1/BARD1 Komplexes im Transkriptionsvorgang und DNA Reparatur (Kerr und Ashworth 2001)

Kommt es zu einem DNA- Doppelstrangbruch gibt es zwei Wege der Reparatur: die sehr genaue und fast fehlerfreie homologe Rekombination (HR) und die non-homologous-end-joining (NHEJ) Reparatur. BRCA1 unterstützt mit dem BRCA1/BARD1 Komplex die DNA Doppelstrangreparatur durch homologe Rekombination (Moynahan und Jasin

2010). Bei dieser dient eine Schwesterchromatide als Matrize und wird für die Schließung der entstandenen Lücke innerhalb des DNA Stranges verwendet, zahlreiche Proteine sind an der Reparatur beteiligt, welche bei Säugetierzellen nur in der S oder G Phase der Meiose stattfinden kann.

Im Falle eines DNA-Doppelstrangbruchs wird BRCA1 über eine Kaskade zur geschädigten DNA-Stelle rekrutiert. Es kommt es zu einer schädigungsbedingten ATM/ATR abhängigen Phosphorylierung von Ser139 und einem bestimmten Histon (H2AX), welches einen weiteren an der Reparatur beteiligten Komplex, Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1) über die BRCA1 C-Terminus (BRCT) Domäne des BRCA1 rekrutiert. Dieses Protein fungiert als Regulator der Intra-S Phase und der G2/M Zellzyklus- Kontrollpunkte und rekrutiert bei Phosphorylierung weitere Reparaturproteine wie die Ubiquitin E3 Ligase und E3 Ubiquitin Ligase Ring Finger Protein 8 (RNF)/Ubiquitin- conjugating enzyme 13 (UBC13) an die geschädigte Stelle innerhalb des DNA Bruches (Mailand et al. 2007; Kolas et al. 2007; Huen et al. 2007; Wang 2012a).

Die verschiedenen Ubiquitinierungen an der „DNA damage site“ führen zur Ausbildung von weiteren wichtigen Andockstellen wie 53BP1 und BRCA1 selbst (Polo und Jackson 2011).

Der für die Reparatur der Doppelstrangbrüche wichtige BRCA1- A Komplex akkumuliert am Doppelstrangbruch (DSB) abhängig vom oben beschriebenen RNF8. Die gebildeten Ubiquitinketten fungieren hierbei als Dockingstation für RAP80 durch sein ubiquitin interacting motif (UIM). Der A-Komplex besteht somit folglich aus BRCA1, dem UIM RAP80, den deubiquitinierenden Enzymen BRCC36 und BRCC45, MERIT 40 und dem Adapterprotein ABRAXAS (Harris und Khanna 2011).

Der Komplex rekrutiert durch die Interaktion von RAP 80 mit K63 Polyubiquitinketten BRCA1 an das Histon H2AX. (Li et al.).

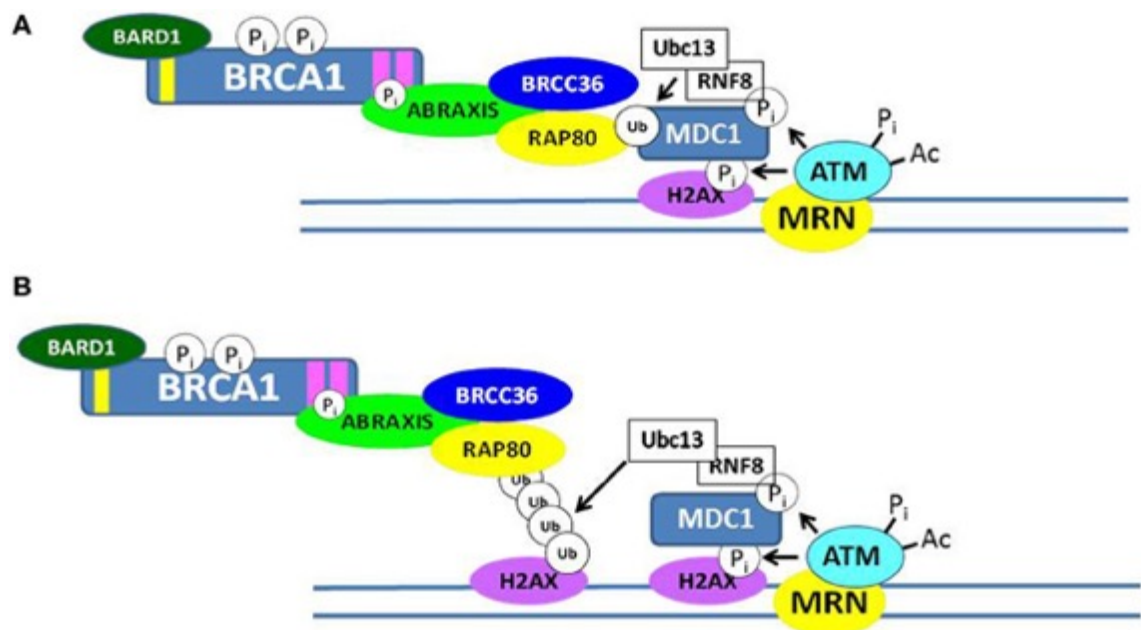


Abbildung 8: Mögliche Wege und Interaktionen bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mit Beteiligung von BRCA1 (Rosen 2013)

A) RNF8 bindet MDC1, welches mit Hilfe von E2 ubiquitiniert wird. RAP80 als Teil des BRCA1A Komplexes bindet über sein UIM an MDC1 und rekrutiert BRCA1 an IRIF durch Abraxas.

B) RNF8 und RNF168 unterstützen die Polyubiquitinierung des Histons H2AX durch Ubc13. Die Ubiquitininkette wird wieder durch Rap 80 erkannt und BRCA1 rekrutiert.

Die exakte Rolle von BRCA1 und der beteiligten Proteine ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein weiterer wichtiger Baustein in der HR scheint das RAD50 Protein zu sein. Gorodetska et al. beschreibt, dass es bereits im ersten Schritt der homologen Rekombination als Teil des MRN Komplexes (mre11-RAD50-NbsI) zusammen mit CtIp aus den DSB Enden ssDNA generiert. Abhängig von BRCA1 und BRCA2 greift der RAD51-ssDNA homologe ds-DNA an *RAD51* formt dabei ein helicales Nukleofilament um die ssDNA (Benson et al. 1994). Dieses sucht homologe DNA Sequenzen auf dem Schwester- Chromatid und öffnet die Duplexstruktur. Rad51 löst sich nach Bildung eines „jointmolecule“ von der dsDNA ab und das 3'Ende der geschädigten DNA wird durch Polymerasen ligiert. Die Bindung von RAD51 an dsDNA würde die initialen Schritte der homologen Rekombination in vivo unterbinden. Durch die Bindung von BRCA2 an RAD51 wird gewährleistet, dass dieses an die gewünschte ssDNA bindet. BRCA2 stellt sicher, dass RAD51 an die DNA damage sites gebracht wird. Es erleichtert so die korrekte Filament-Formation und ist Wegbereiter für das korrekte Ablaufen einer HR (Gorodetska et al. 2019).

Die folgende Abbildung stellt vergleichend die Rollen von BRCA1 und BRCA2 in der DNA-Reparatur dar.

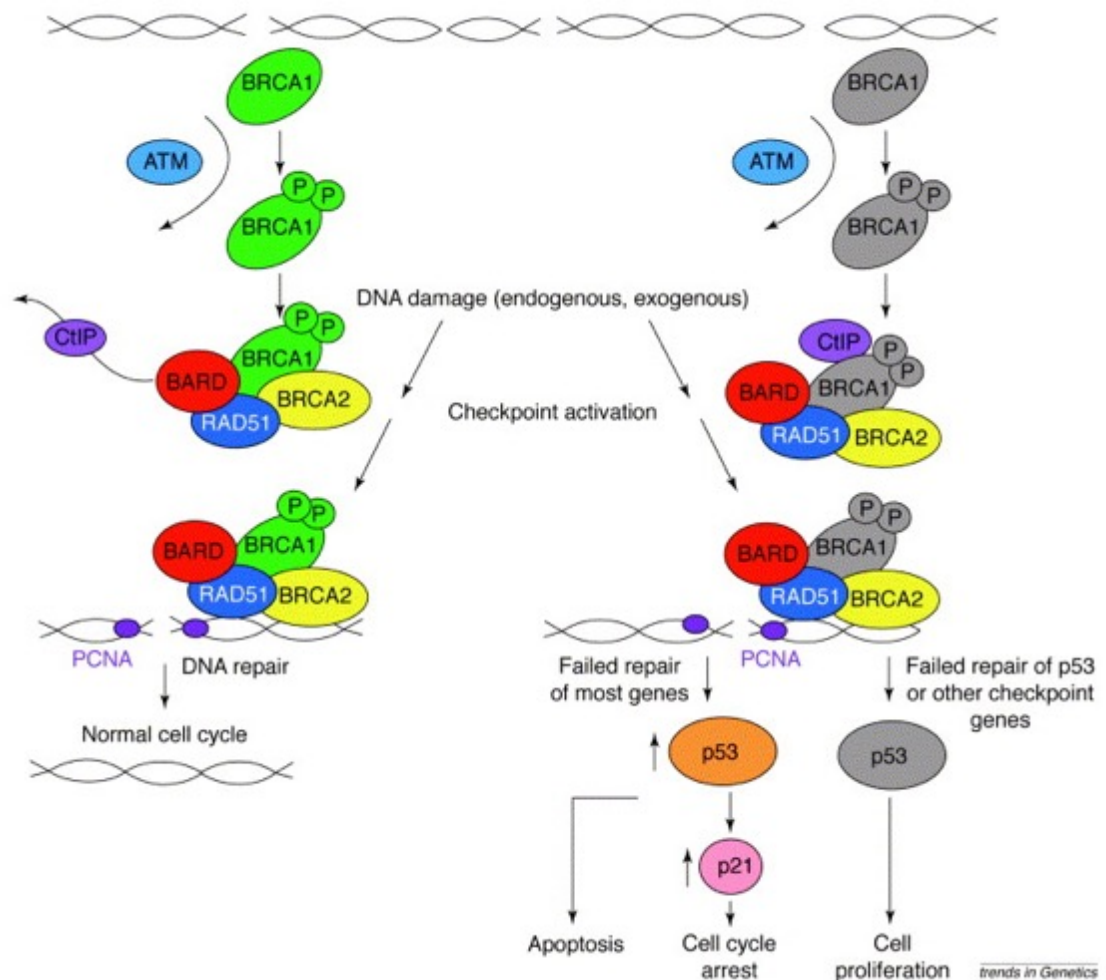


Abbildung 9: Die Rolle der BRCA-Gene in der DNA Reparatur  
(Welch et al. 2000)

Kommt es zu einem DNA- Doppelstrangbruch wird der Komplex aus BRCA1, BRCA2, BARD1 und RAD51 an die Stelle der Schädigung rekrutiert und durchläuft die DNA Replikation mit Hilfe des Ringklemmprotein PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Im Zuge der DNA Schädigung kommt es zu einer Phosphorylierung von BRCA1, in dessen Folge CtIp und BRCA1 ihre Bindung lösen. Wenn BRCA1 oder 2 durch Mutation inaktiviert sind (Abbildung 9, rechte Seite, grau hinterlegt) kommt es zur Anhäufung von DNA Doppelstrangbrüchen und einer checkpoint Aktivierung, was seinerseits in einer Aktivierung von p53 und Überexpression von p21 resultiert. Durch Hemmung der Cyclin-abhängigen Kinasen wegen der erhöhten p53 Level kommt es zum Zellzyklus-Arrest. Wenn kritische Checkpoint- Gene wie p53 nicht korrekt repariert werden, kommt es zur ungehemmten Zellproliferation.

Zusätzlich wurde BRCA1 früh eine Rolle beim Chromatin remodeling und RNA processing zugeschrieben. Bocher et al. beschrieben im Jahr 2000, dass BRCA1 über seinen SWI/SNF Komplex das Chromatin remodeling beeinflusst. Es erleichtert die DNA Doppelstrangreparatur und tritt folglich bei DNA Doppelstrangbrüchen auf. Der genaue Ablauf inwiefern BRCA1 über verschiedene Komplexe am Chromatin remodeling beteiligt ist, wird weiterhin untersucht.

Eine weitere wichtige Rolle spielt BRCA1 bei der Erhaltung der genomischen Stabilität. Zellzykluskontrolle ist elementar, um die Zelle vor Mutationen zu schützen, die in das normale Zellwachstum eingreifen. Diese so genannten cell cycle checkpoints sind Kontrollmechanismen, die dazu in der Lage sind, den Zellzyklus in den Phasen G1/S, S und G2/M anzuhalten, um DNA Schäden zu reparieren (Deng 2006).

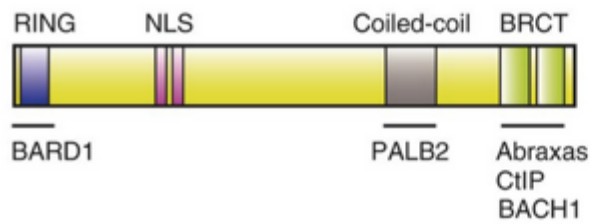
Der BRCA1/RAP80 rekrutiert nicht nur wie oben beschrieben BRCA1 zur geschädigten DNA, sondern unterstützt über mehrere Schritte die Phosphorylierung von CHK1 und aktiviert auch den G2/M checkpoint (Kim et al. 2007). Weitere Komplexe wie der CtIp-BRCA1 und der BACH1-BRCA1 Komplex sind in das Geschehen der Zellzyklusregulierung eingeschaltet. (Takaoka und Miki 2018). Aus diesem komplexen Zusammenspiel ergibt sich, dass der Verlust der BRCA1 Funktion sowie die Inaktivierung von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind, die Tumorgenese positiv beeinflussen könnten.

## **BRCA2**

Das BRCA2 Gen ähnelt im Aufbau dem des BRCA1. Es verfügt über einen N- Terminus sowie einen C-Terminus, welcher mittig die BRC repeats umrahmen. Die BRC repeats (Exon 11) sind für Interaktionen und Bindung von *RAD51* wichtig.

BRCA2 ist im Vergleich zu BRCA1 weniger intensiv untersucht und verstanden. Wie auch BRCA1 ist BRCA2 an der homologen Rekombination beteiligt, welches die wichtigste Funktion von BRCA2 darstellt (Jensen 2013).

Human BRCA1 (1863 aa)



Human BRCA2 (3418 aa)

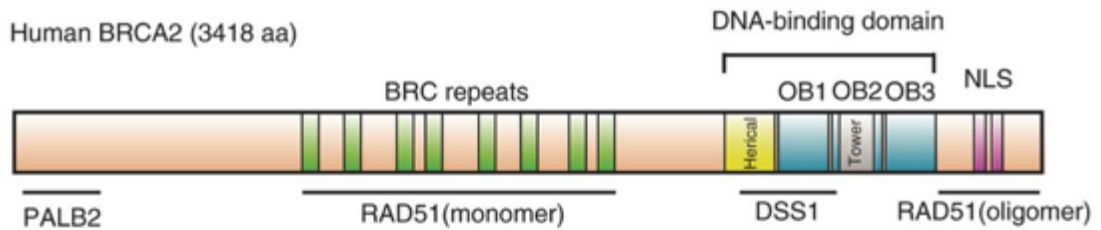


Abbildung 10: Aufbau BRCA2 Protein im Vergleich zu BRCA1 (Katsuki und Takata 2016)

Ein weiterer wichtiger Bindungspartner von BRCA2 stellt partner and localizer of BRCA2 (PALB2), dar. Das Protein wurde entdeckt als Bindeglied zwischen BRCA1 und BRCA2 (Sy et al. 2009, 2009; Roy et al. 2012b). Somit ist PALB2 eins der Schlüsselproteine zum korrekten Ablauf der HR, da es gewährleistet, dass BRCA2 und RAD51 zum Ort der geschädigten Doppelstrang DNA rekrutiert werden. Durch die Bindung der beiden BRCA Proteine untereinander wird deutlich, dass beide essentielle Rollen in der HR einnehmen (Huyton et al. 2000; Scully et al. 1997).

Zellen mit Mutation im BRCA2 Gen sind nicht in der Lage RAD51 zur geschädigten Stelle am DNA Doppelstrang zu rekrutieren. Durch Fehlfunktion dieses initialen Schrittes kann die HR nicht korrekt ablaufen.

Zweite wichtige Funktion von BRCA2 stellt seine Rolle bei der Protektion der Replikationsgabeln da. Es scheint zentraler Faktor als Stabilisator bei ins Stocken geratenen Replikationsgabeln zu sein (Roy et al. 2012a).

Inwiefern die Funktion von BRCA2 die Regulation der Duplikation von Zentromeren beeinflusst, bleibt soweit unklar. Tatsache ist, dass es in BRCA defiziente Zellen vermehrt zu Aneuploidien kommt, welche mit dieser möglichen (Teil-) Funktion von BRCA2 in Zusammenhang stehen (Fradet-Turcotte et al. 2016).

Es erscheint sinnvoll die beiden BRCA-Proteine in ihrer Funktion auch als Einheit zu beleuchten. Einige Aufgaben auf molekularer Ebene werden durch das Zusammenspiel



von beiden Genen beeinflusst. Hierzu gehört deren Aufgabe als „Genomwächter“: sie sorgen für das Aufrechterhalten der genomischen Stabilität. Ist eines der beiden BRCA Proteine defekt, kommt es in der Folge zur genomischer Instabilität mit dem Risiko der Entwicklung von chromosomalen Aberrationen (Venkitaraman 2001; Boulton 2006). Des Weiteren sind beide Gene und deren Proteine in das Geschehen des korrekten Ablaufes der HR bei DNA-Doppelstrangbruch und der transkriptionellen Regulation eingeschaltet (Yoshida und Miki 2004).

### **2.2.3 Genetische Testung**

#### ***Erbgang und second-hit Theorie***

BRCA-Mutationen und deren Vererbung folgen einem autosomal- dominantem Erbgang, die Vererbung wird folglich mit 50% Wahrscheinlichkeit an die Nachkommen weitergegeben, unabhängig vom Geschlecht (Leinert et al. 2018).

BRCA-Mutationen werden in Keimbahnmutationen und somatische Mutationen unterteilt. Keimbahnmutationen werden an jede Tochterzelle weitergegeben und befinden sich folglich in jeder Körperzelle. Beim Ovarialkarzinom sind ca. 14 % der BRCA Mutationen (BRCA1 ca. 8%, BRCA2 ca. 6%) assoziiert mit Mutationen in der Keimbahn. Somatische Mutationen entstehen oft im Laufe des Lebens während der Entartung der Zelle. Demnach liegen somatische Mutationen nur in den Tumorzellen vor. Sie sind für die Zelle insofern gefährlich, da sie Tumorsuppressorgene inaktivieren und Onkogene aktivieren können (Runnebaum 2009).

Hierauf basierend unterscheidet sich auch die Art der genetischen Testung: Keimbahnmutationen können im Blut, im Speichel und im Tumor nachgewiesen werden, somatische Mutationen nur im Tumorgewebe. Der Pathologe, der das Tumormaterial zur Beurteilung bekommt, vermag nicht zu unterscheiden, um was für eine Mutationsform sich es bei positivem BRCA-Status handelt, da er kein gesundes Material zum Vergleich erhält. Die Untersuchung und Unterscheidung ob es sich um eine Keimbahn oder somatische Mutation handelt, obliegt einem Humangenetiker mit zusätzlicher Ausbildung in diesem Fachgebiet (Löser et al.). Möchte der Patient Aufschluss über die Art der Mutation, gibt es spezielle Gendiagnostikzentren mit Humangenetikern die berechtigt sind, weiterführende Analysen zu veranlassen. Da das Ergebnis einer Keimbahnmutation potenzielle klinische Konsequenzen nach sich zieht und Fragen nach weiterer familiärer Belastung aufwirft, unterliegt die Keimbahntestung seit 2010 den



Anforderungen des Gendiagnostikgesetzes und ist an eine humangenetische Beratung gebunden.

Nach Empfehlung der Gendiagnostik Kommission (GEKO) des RKI ist für die Regelzuständigkeit des Gendiagnostikgesetzes die Indikation zur genetischen Testung entscheidend (Löser et al.). Eine Analyse des Tumorgewebes fällt im Gegensatz zur Keimbahnanalyse allerdings nicht unter das Gendiagnostikgesetz, da der Zweck die Feststellung einer BRCA Mutation als Biomarker für das Ansprechen einer eventuellen medikamentösen Therapie betrifft. Der Untersuchungszweck ist nicht darauf ausgerichtet durch Unterscheidung von Keimbahn und somatischer Mutation eine Erblichkeit festzustellen (Bauer et al. 2016).

### ***Second hit Theorie***

Die BRCA1- und BRCA2 Gene sind Tumorsuppressorgene. Sie sind in der Lage die Proliferation spezifischer Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt im Zellzyklus wieder zu beenden. Die Relevanz dieser Gene und ihrer Funktion zeigt sich in direkter Beteiligung an der Zellteilung sowie indirekter Einflussnahme auf das korrekte Ablaufen des DNA-Reparaturvorganges. Sie sichern genomische Stabilität. In gesunden Zellen liegen zwei Allele eines Tumorsuppressors vor, die Funktionsfähigkeit eines Allels reicht in der Regel aus, um Schutzfunktion zu gewährleisten. Mutationen in solchen Genen werden sowohl in sporadischen als auch in hereditären Tumorerkrankungen gefunden.

In Knudsons „second hit“ Theorie fällt erst das erste, dann das zweite Allel aus. Hierbei kommt es zu ungewollter Proliferation von Zellen, wenn beide Allele des Tumorsuppressorgens inaktiviert werden. Bei somatischen Mutationen passieren beide Ereignisse oft zufällig, während bei erblichen Mutationen das erste Allel eine genetische Prädisposition tragen kann und das zweite entweder zufällig verloren geht oder ein funktionsunfähiges Protein hervorbringt. Dieses erste Ereignis wird „loss of function“ Mutation genannt (LOF). Da sie auf zellulärer Ebene rezessiv wirken, entsteht ein Tumor erst, wenn auch das beschriebene zweite intakte Allel eine Mutation, einen „second hit“ erfährt (loss of heterozygosity, LOH) (Knudson 1971).

### ***Mutationsarten***

Bisher kennt man bis zu eintausend verschiedene mögliche Mutationsarten der beiden BRCA-Gene, welche maßgeblich an der Entwicklung von Mamma- und Ovarialkarzinomen beteiligt sind. Kommt es zu einer Deletion (Verlust einer Aminosäure) kann daraus eine Frameshift- oder Nonsensemutation entstehen. Bei einer Frameshiftmutation kommt es innerhalb der Proteinbiosynthese zu einer Verschiebung

im Leseraster mit der Folge, dass eine andere Aminosäuresequenz und folglich ein anderes Protein entsteht. Bei einer Nonsensemutation kommt es innerhalb der Proteinbiosynthese zum Einbau eines Stopp-Codons, was ein verkürztes und damit funktionseingeschränktes Protein hervorbringt. Diese Mutationsform mit einfachem Austausch eines Basenpaares machen bei den BRCA-Mutationen ca. 10 Prozent aus. Die häufigsten Mutationen neben Nonsensemutationen sind Frameshiftmutationen (Leserasterverschiebung), welche mit 71 Prozent aller Mutationsarten den Großteil ausmachen (Prieshof und Costa 2006).

Bei der BRCA1-Mutation kommt es gehäuft zu einer Veränderung der Basenabfolge innerhalb der Proteinbiosynthese, die entweder zu einem Verlust eines Basenpaares (Deletion) oder einem zusätzlichen Einbau (Insertion) führt. Zurzeit sind ca. 1.600 verschiedene Mutationen im BRCA1-Gen bekannt, die meisten davon stellen Frameshift Mutationen dar, die in einem Missense (Fehlsinnmutation, Punktmutation mit Basenaustausch) oder einem funktionslosen Protein resultieren (Godet und Gilkes 2017). Die Funktion des BRCA2-Proteins wurde früh mit dem Ursprung von sechs verschiedenen Keimbahnmutationen beim Mammakarzinom in Verbindung gebracht. Hierbei kommt es zu einer Unterbrechung des „open reading frame“, einer transkriptionalen Untereinheit. Auch hierbei handelte es sich überwiegend um Deletionen und Frameshift-Mutationen, die zu einem Stoppcodon führen. Das Ergebnis sind veränderte oder funktionsunfähige Proteine. Insgesamt sind über 1.800 Mutationen im BRCA2-Gen bekannt (Godet und Gilkes 2017).

### ***NGS und DHPLC***

Das NGS ist Mittel der Wahl um die Charakterisierung der Mutation im Hinblick auf Art und Position innerhalb der BRCA-Gene zu klassifizieren. Mit dem NGS können alle verschiedenen Arten von Mutationen wie Frameshift-, Missense- und Nonsensemutation detailliert nachgewiesen werden.

Frühere Ansätze einer „Vorscreening“-Methode, wie zum Beispiel die Denaturierungs-Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (DHPLC) zur genomischen DNA-Sequenzierung stehen dem NGS mittlerweile in der Validierung von Sensitivität/Spezifität nach, sowie im Kosten- und Zeitpunkt. Das NGS Verfahren dauerte im Schnitt 10 Tage, während die DHPLC Methode drei Monate in Anspruch nahm. Alle Reagenzien zusammengerechnet, ist das NGS am Ende die kostengünstigere Variante, weshalb die Gensequenzierung durch NGS mittlerweile zum Goldstandard in der Mutationsdiagnostik zählt (D'Argenio et al. 2015).

### ***Voraussetzungen zur Mutationsanalyse***

Das deutsche Konsortium für familiären Brust- und Eierstockkrebs sieht einen Gentest mit Verdacht auf Genveränderung in den Risikogenen bei folgenden Familienkonstellationen vor:

Mindestens drei an Brustkrebs erkrankte Frauen aus der gleichen Linie einer Familie, unabhängig vom Alter der Erstdiagnose
Mindestens zwei an Brustkrebs erkrankte Frauen aus der gleichen Linie einer Familie, davon eine mit einem Ersterkrankungsalter vor dem 51. Lebensjahr
Mindestens zwei an Eierstock erkrankte Frauen aus der gleichen Linie einer Familie
Mindestens eine an Brustkrebs erkrankte Frau und mindestens eine an Eierstockkrebs erkrankte Frau oder eine an Brust- und Eierstockkrebs erkrankte Frau
Mindestens eine an Brustkrebs erkrankte Frau vor dem 36. Lebensjahr
Mindestens eine an beidseitigem Brustkrebs erkrankte Frau, deren Ersterkrankung vor dem 51. Lebensjahr diagnostiziert wurde.
Mindestens ein an Brustkrebs erkrankter Mann und zusätzlich eine an Brust- oder Eierstockkrebs erkrankte Frau
Mindestens einer an einem triple-negativen Brustkrebs erkrankte Frau vor dem 50. Lebensjahr
Mindestens eine an Eierstockkrebs erkrankte Frau vor dem 80. Lebensjahr

Tabelle 7: Indikatoren für eine BRCA-Mutationsanalyse (Kast et al. 2016; Schmutzler und Rhiem 2017)

Die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Genveränderung beträgt bei diesen Familienkonstellationen über zehn Prozent.

#### **2.2.4 Polyadenosin-5'-diphosphoribose-Polymerase (PARP)-Inhibitor**

##### **Behandlung bei Frauen mit positivem BRCA Status**

Die Behandlung des Ovarialkarzinoms mit einem PARP-Inhibitor ist seit Januar 2015 für die Erhaltungstherapie nach Ansprechen auf eine platinhaltige Rezidivchemotherapie bei

Patientinnen mit positivem BRCA-Status und einem high-grade serösem OVCA zugelassen (Keimbahn-oder somatische Mutation) (Bischoff 2018).

PARP-Inhibitoren blockieren die enzymatische Aktivität von PARP. PARP gehört zu einer Gruppe von Enzymen, die an der Basenexzisionsreparatur, einer Einzelstrangbruchreparatur der DNA beteiligt sind. Wird das Enzym PARP inhibiert, zerfällt die Replikationsgabel und Einzelstrangbrüche werden in Doppelstrangbrüche konvertiert. In gesunden Zellen wird ein Doppelstrangbruch auf zwei Weisen repariert: über die homologe Rekombination (HR) oder die nicht- homologe Endverknüpfung.

Bei Zellen mit BRCA-Mutation ist der Weg der HR defekt und die Zelle ist so auf einen alternativen Weg der Reparatur angewiesen. Wird jedoch dieser durch PARP-Inhibitoren inhibiert, wird die Zelle in den Zelltod getrieben (Farmer et al. 2005).

In Deutschland sind aktuell drei PARP-Inhibitoren für die Behandlung beim fortgeschrittenen OVCA allgemein zugelassen: Olaparib, Niraparib und Rucaparib. Olaparib ist der erste PARP-Inhibitor gewesen, der zur Erhaltungsmonotherapie bei Platin-geeignetem Rezidiv eines high-graden OVCA nach platinbasierter Chemotherapie zugelassen wurde. Aktuell ist die Indikation nicht an das Vorliegen einer BRCA-Mutation gebunden. Niraparib darf ebenfalls unabhängig vom BRCA-Mutationsstatus als Erhaltungsmonotherapie beim Rezidiv eines platinsensiblen, gering differenzierten OVCA eingesetzt werden. Rucaparib ist als einziger PARP-Inhibitor initial nur bei BRCA-mutierten Tumoren zugelassen gewesen, er darf als Monotherapie bei rezidiviertem oder progredientem platinsensiblen high-grade OVCA Anwendung finden, nachdem zwei oder mehr platinhaltige Chemotherapien angewendet wurden und ein weiterer Zyklus nicht infrage kommt (Marmé et al. 2019). Aufgrund von groß angelegten Studien (NOVA und ARIEL) konnte für Niraparib als auch für Rucaparib eine signifikante Verbesserung des medianen progressionsfreien Überleben (PFS) auch für nicht BRCA-mutierte OVCA nachgewiesen werden (Mirza et al. 2016; Coleman et al. 2017).

Der Effekt der Therapie mit PARP-Inhibitoren ist bei BRCA-mutierten OVCA höher als bei nicht mutierten. Bei den Patientinnen mit positivem BRCA-Status wird Olaparib trotz eines ähnlichen Nebenwirkungsprofils der Vorrang gewährt. Wie PARP-Inhibitoren in der Erhaltungstherapie in die Erstlinientherapie vorrücken könnten und wie/ob weitere Immuntherapie-Ansätze, wie Anti-PDL-1-Antikörper in die Therapie des Ovarialkarzinoms integriert werden könnten, müssen weitere Studien zeigen (Taubé et al. 2019).

### **2.2.5 Früherkennungs- und Prophylaxemaßnahmen**

Bei Mutationsträgerinnen mit positivem BRCA-Status werden spezielle Vorsorgemaßnahmen angeboten und empfohlen. Auch Frauen aus Hochrisikofamilien, die keine Mutation tragen aber ein Lebenszeitrisiko von über 20 Prozent haben an einem OVCA zu erkranken, wird angeraten ein standardisiertes Früherkennungsprogramm zu durchlaufen.

Hierbei sei erwähnt, dass Früherkennung und Prophylaxe durchaus Überschneidungspunkte besitzen, da sie beide Teile der Prävention darstellen. Prinzipiell sind sie aber getrennt voneinander zu betrachten.

#### **2.2.5.1 Früherkennung**

Bei der Früherkennung ist primäres Ziel die Senkung der Mortalität. Wie beim Nichtrisikopatient ist auch beim Hochrisikopatient eine Früherkennung schwierig, da das OVCA wenig bis keine verlässlichen Frühsymptome zeigt (Kommoss et al. 2016; Kroeger, JR und Drapkin 2017).

Der transvaginale Ultraschall sowie die Bestimmung des Tumormarkers CA 125 können zur Früherkennung durchgeführt werden. Der Tumormarker CA 125 ist allerdings nicht sehr spezifisch (Mahner et al. 2009) und eher im Verlauf der Erkrankung aussagekräftig. Keine dieser Früherkennungsmaßnahmen konnte signifikant die Mortalität senken (Hillemanns 2014) und wird deshalb aktuell laut Leitlinie nicht mehr empfohlen.

#### **2.2.5.2 Prävention**

Im folgenden Abschnitt wird nur auf die Primärprävention und in diesem Zuge auf die prophylaktischen Operationen eingegangen.

##### ***Bilaterale Salpingo- Oophorektomie***

Laut den aktuellen Leitlinien der AGO sollten Frauen mit nachgewiesener BRCA-Mutation über die bilaterale Salpingo-Oophorektomie beraten werden. Bei diesem Eingriff werden beidseitig jeweils Tuben und Ovarien entfernt. Das Erkrankungsrisiko für ein Ovarialkarzinom kann hierbei auf bis zu 1-2% gesenkt werden und die Gesamtmortalität um bis zu 75%, vorausgesetzt der Eingriff findet vor der Menopause statt (Rhiem und Pfeifer 2014).

Durch verschiedenen Studien bewegt sich der Zeitraum für einen prophylaktischen Eingriff bei BRCA1-Mutation zwischen dem 35. und 40. Lebensjahr, bei BRCA2 zwischen dem 40. und 45. Lebensjahr. Verallgemeinert hält Meindl et al. fest, dass die

Salpingoovarektomie um das 40 Lebensjahr stattfinden sollte, oder fünf Jahre vor dem frühesten Erkrankungsalter anderer Familienmitglieder (Meindl et al. 2011; Rhiem).

### ***Bilaterale Salpingektomie***

Als Alternative bietet sich die bilaterale Salpingektomie an, die ebenfalls einen risikominimierenden Effekt aufweist, allerdings weniger protektive Wirkung auf das Ausbilden eines Ovarialkarzinoms hat. Hierbei werden nur die Tuben entfernt, die Ovarien bleiben erhalten. Dieser Eingriff ist bei Patientinnen, bei denen Kinderwunsch besteht zu überlegen, da die Fertilität erhalten bleibt. Ob dieser Schritt reicht um das Karzinomrisiko zu senken bleibt fraglich, da einige Ovarialkarzinome (23 %) weiterhin von den Ovarien ausgehen (Bolton et al. 2012).

### ***Ovarektomie***

Die Entfernung der Eierstöcke ist die am häufigsten beschriebene Methode um ein Ovarialkarzinom vorzubeugen. Oft werden bei der oben beschriebenen Salpingektomie das Ovar oder die Ovarien mitentfernt. Hierbei geht es nicht nur um eine Risikoreduktion für das Erkranken an einem Ovarialkarzinom, sondern auch das Risiko der Mammakarzinominzidenz sinkt durch Ausschalten der ovariellen Hormonsynthese (Domchek et al. 2010; Leinert et al. 2017).

Es scheint, als nähme der Nutzen dieser prophylaktischen Operation mit zunehmendem Alter ab, eine genaue Altersgrenze ist aktuell nicht festgelegt. Da BRCA1-Mutationsträgerinnen oft jungen Alters bei Erstdiagnose sind, wird oft das 35. Lebensjahr oder der Abschluss der Familienplanung als guter Zeitpunkt empfohlen (Kuschel et al. 2009).

### ***Medikamentöse Chemoprävention***

Die Einnahme von oralen Kontrazeptiva ist mit einem protektiven Effekt auf die Entstehung des Ovarialkarzinoms assoziiert und kann das Langzeitrisiko um 50% und die Mortalität um 80 % senken (Vessey und Painter 1995; Beral et al. 1999).

## **2.2.6 Untersuchte Proteine**

### **2.2.6.1 HSPC 142**

HSPC (hematopoietic stem and progenitor cells) 142 gehört zu einer Gruppe von Proteinen, welche auf dem BRISC and BRCA1 A complex Member (BABAM1) Gen lokalisiert sind und eine Komponente des BRCA1A Komplexes darstellen (BRISC And BRCA1 A Complex Member 1). Das Protein ist in vielen unterschiedlichen Geweben im

Kern und im Zytoplasma vorhanden. BRCA1 formt drei Komplexe: BRCA1A, BRCA1B und BRCA1C. Der BRCA1A Komplex besteht neben BRCA1 mit einem Ubiquitin Interacting Motif (UIM) aus RAP80, BRCC36 und BRCC45, Mediator of RAP80 Interactions and Targeting 40 kd (MERIT40) und dem Adapterprotein Abraxas (Harris und Khanna 2011). HSPC 142 als Antikörper wird in der Literatur mehrfach synonym durch MERIT40/NBA1 ersetzt. Dass BRCA1 ein großes Protein mit multiplen funktionellen Domänen ist und mit mehreren Komplexen interagiert, um eine Antwort der Zelle auf DNA Schädigung zu generieren ist bekannt (Deng und Brodie 2000). Einer dieser Komplexe, die dazu führen, dass BRCA1 an die geschädigte DNA-Seite bindet, besteht aus einem Ubiquitin- Interacting Motif (UIM) mit RAP80, CCDC98/Abraxas und einem Deubiquitinierungsprotein BRCC36. Eine neue Komponente dieses Komplexes, MERIT40 verstärkt die BRCA1 abhängige Antwort auf DNA Schädigung (Feng et al. 2009). RAP80 seinerseits kann ebenfalls mit MERIT40/HSPC142 und drei weiteren Proteinen interagieren : ABRAXAS, BRCC36, BRCC45 (Shao et al. 2009). HSPC142 nimmt als essenzieller Bestandteil von RAP80 und innerhalb des BRCA1/BARD1 Komplexes eine tragende Rolle bei dessen Rekrutierung und Verweilung an geschädigten Abschnitten der Doppelstrang Struktur der DNA ein, vor allem in der S-Phase des Zellzyklus („DNA damage response“) (Jiang et al. 2015).

#### 2.2.6.2 BAP1

BRCA assoziiertes Protein 1 (BAP1) ist ein Deubiquitinierungsenzym, welches auf dem BAP1 Gen liegt. Das kernständige Protein besitzt eine Ubiquitin-Hydrolase-Domäne, durch welche es die Fähigkeit zum Deubiquitinieren erlangt. Humanes BAP1 besteht aus 729 Aminosäuren mit drei Domänen (Boulton 2006).

1. UCH (Ubiquitin carboxyl-terminale Hydrolase) N-terminus katalytische Region, welche das Ubiquitin von bereits ubiquitinylierten Substraten entfernt,
2. Einer Linker- Region, welche eine Host cell factor C1 Bindungsdomäne inkludiert
3. Dem C Terminus

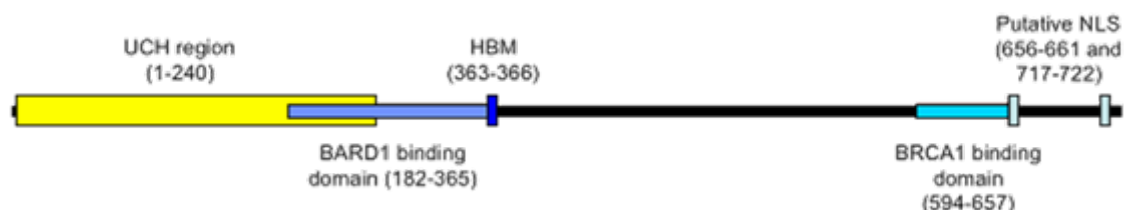


Abbildung 11: Struktur des BAP1 Gen (Guénard und Durocher 2011)

BAP1 als Protein kodiert für ein Deubiquitinierungsenzym (DUB), hat Schlüsselfunktion in der Regulierung von zellulären Prozessen wie Zellzykluskontrollen (Checkpoints), Transkription und DNA Reparaturvorgängen. Als Enzym des H2A Komplexes greift es in den Regulationsprozess und das „remodeling“ des Chromatins ein, indem es die Histone H2A und H2AFY1 deubiquitiniert. Die Abspaltung von Ubiquitin, die als posttranskriptionale Modifikation bekannt ist, nimmt Proteasomen die Möglichkeit das Protein zu degradieren (Ubiquitin markierte Proteolyse).

Über die Ringfingerdomäne bindet BAP1 an BRCA1 (Boulton 2006, S. 637) sowie über die Domänen 182-365 an die Ringfingerdomäne von BARD1 (Guénard und Durocher 2011, S.2). Somit interagiert es mit dem gesamten Komplex von BRCA1/BARD1.

BAP1 unterstützt die BRCA1 abhängige Inhibition von Krebszellwachstum in Brustkrebszellen (Carbone et al. 2013, S.2).

Laut Guenard et al. interagiert es mit HCF1, einem Co-Transkriptionsfaktor, der in vielen wichtigen Regulatorkomplexen eine Rolle zu spielen scheint. BAP1 könnte durch eine Regulierung des HCF1 Protein- Levels an der Kontrolle der Zellregulation beteiligt sein.

Der BRCA1/BARD1 Komplex besitzt E3- Ubiquitin- Ligase- Aktivität mit welcher er sich selbst sowie andere Proteine ubiquitinieren kann (Wang et al. 2017; Wang 2012a, S.1). Allerdings hat nicht jeder Teil der Ringfingerdomäne Ligase-Aktivität, präferiert sind die großen Abschnitte des Ringfingers. Dies führt zu dem Schluss, dass Sequenzen die außerhalb des Ringfingersequenz liegen, für die E3 Aktivität essentiell sind (Mallery 2002).

BAP1 deubiquitiniert BARD1 und moduliert die Aktivität der E3 Ligase des BRCA/BAP1 Komplexes (Carbone et al. 2013, S.3) Gleichzeitig hemmt BAP1 die E3 Ubiquitin Ligase Aktivität des BRCA1/BARD1 Komplexes indem es an die Ringfingerdomäne des BARD1 bindet und verhindert so eine Autoubiquitinierung des Komplexes durch sich selbst.

Es ist möglich, dass BAP1 und BRCA1/BARD1 abwechselnd und koordiniert die Deubiquitinierung während des DNA Reparaturvorganges als auch im Zellzyklus regulieren. BAP1 wird während des Vorganges der DNA Reparatur durch ATM und ATR phosphoryliert.

Des Weiteren geht man davon aus, dass BAP1 das BRCA Protein stabilisieren kann und es somit vor dem Abbau durch Proteasomen schützt (JENSEN und RAUSCHER 1999, S.



2). Andererseits könnte BRCA1 modulierende Wirkung auf BAP1s Fähigkeit haben, andere Proteine zu aktivieren.

BAP1 ist in verschiedenen Geweben im menschlichen Organismus exprimiert, hohe Expression findet sich in Geweben wie Testis, Plazenta, Ovar und Mamma.

Eine Mutation im BAP1 Gen unterbindet die BRCA1/BARD1 Interaktion über den C-Terminus. Um als Tumorsuppressorgen fungieren zu können ist BAP1 auf seine enzymatische Deubiquitinierungs- Eigenschaft sowie die nukleäre Lokalisation angewiesen (Guénard und Durocher 2011, S. 2).

### **2.2.6.3 CtIp**

CtBP-interacting protein (CtIp) ist ein nukleäres Protein, welches ursprünglich als interagierender Partner des Co-Transkriptionsfaktors CtBP entdeckt wurde. Es befindet sich auf Chromosom 18q11.2 (Fusco et al. 1998).

CtIp ist ein multifunktionales Protein, welches in viele verschiedene zelluläre Prozesse involviert ist. Neben Beteiligung an der Transkription, der DNA Replikation und Reparatur sind vor allem folgende zwei Funktionen essentiell: Kontrolle der Zellzyklus Checkpoints G1 und G2 sowie die homologe rekombinante DNA Reparatur (Wang et al. 2016). Über die BRCT Domäne des BRCA1 kann CtIp an dieses binden. Es ist Zielprotein einer BRCA1 abhängigen Phosphorylierung durch die ATM Kinase bei DNA Doppelstrangbruch (Wang et al. 2012b).

Die Interaktion zwischen CtIp und BRCA1 findet nur während der G2 Zellzyklusphase statt und ist für die Aktivierung der checkpoint Kinase 1 nach DNA Schädigung nötig (O'Donovan und Livingston 2010).

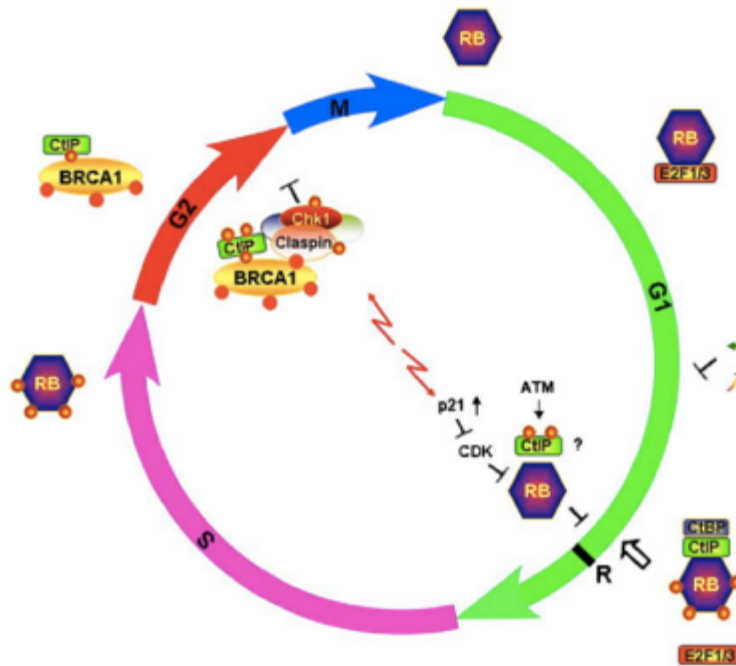


Abbildung 12: Funktionen von CtIp im Rahmen der verschiedenen Zellzyklus-Phasen nach Chinnadurai

Die Bindung von CtIp an BRCT geht bei Tumor-assoziiierter Missense und Nonsense-Mutation verloren. Der Verlust dieser Bindung bei der Karzinomentstehung legt nahe, dass die Interaktion von CtIp und BRCA1 bei der Tumorentstehung- und suppression eine zentrale Rolle zu spielen scheint (Chinnadurai 2006). Die Verbindung zwischen CtIp, BRCA1 und MRN wurde auch in der Arbeit von Aparicio et al dargestellt. Zellen, die funktionsunfähiges CtIp besitzen, reagieren hypersensibel auf das Chemotherapeutikum Etoposid. Die Arbeit zeigte, dass der Komplex aus CtIp, BRCA1 und MRN Zellzyklus regulierende Nuklease-Aktivität besitzt, welches die DNA Replikation unterstützt und am korrekten Ablauf der HR beteiligt ist (Aparicio und Gautier 2016). Der komplette Ablauf der DNA Reparatur hätte folglich ohne funktionstüchtiges CtIp Protein erhebliche Mängel, in dessen Folge es zu genomischer Instabilität und einer erhöhten Entartungsrate der Zelle kommen würde.

#### 2.2.6.4 BAAT-1

BAAT1, in der Literatur synonym als BRAT1 verwendet steht für „BRCA1 associated ATM activator 1“. Das Protein dieses Gens ist in der Lage ebenfalls an die BRCT Domäne des Tumorsuppressors BRCA1 zu binden. Das BAAT1-Gen hat eine Größe von 17kb und befindet sich auf Chromosom 7p22.3. BAAT1 mRNA wird ubiquitinin-abhängig in verschiedenen Geweben wie z.B. im Hoden, Pankreas, Prostata, Speicheldrüse und im Cortex exprimiert.

Neben der Fähigkeit an BRCA1 zu binden ist BAAT1 auch ein ATM bindendes Protein (Aglipay et al. 2006). Ist die Zelle ionisierender Strahlung ausgesetzt, steigt endogenes BAAT1 an, vor allem jenes, welches an ATM bindet. Da auch das in der damage repair eine wichtige Rolle spielende Histon H2AX mit BAAT1 interagieren kann, geht man davon aus, dass auch dieses Protein einen Stellenwert in der homologen Rekombination hat (Ouchi et al. 2010).

Weiterhin wurde gezeigt, dass BAAT1 nicht nur Interaktionen mit ATM eingeht, sondern auch an DNA- PKCs (DNA dependent protein kinase catalytic subunit) und SMC1 bindet (So und Ouchi 2011).

Wie genau BAAT1 die DNA-PKCs reguliert ist noch unklar, eine Beteiligung von KU70/80 wie bei der DNA Reparatur ist zurzeit nicht bestätigt. Vielmehr nimmt man an, dass BAAT1 phosphorylierte Anteile der Kinasen (ATM und PKCs) beschützt als aktiv an deren Aktivierung beteiligt zu sein.

Zusammenfassend sind ATM Kinasen und PKC, denen BAAT1 fehlt nicht in der Lage an die DNA Läsionen zu binden. Dies führt zu eingeschränkter korrekter Reparatur von Schädigungen an der DNA und somit zur Gefahr der Entartung dieser Zellen.

#### **2.2.6.5 FANCI**

FANCI, auch bekannt als BACH1 oder BRIP1 ist eigentlich Mitglied der FANCI (Fanconi anemia) Familie. Es ist auf Chromosom 17, 17q22 lokalisiert und fungiert ebenfalls als ein nukleäres, an BRCA1 bindendes Protein. Es bindet auch an die BRCT Domäne des BRCA1. Drei Proteine interagieren hierbei direkt über den C-Terminus von BRCA1 mit dessen BRCT Domäne: Abraxas, Brip1 und CtIp (RBBP8). Die Interaktion ist phosphorylierungsabhängig und formt drei große Komplexe, welche als BRCA1A, B und C bekannt sind (Wang 2012a; Yu et al. 2003).

Die Funktion von BRIP1 ist vielfältig. Es ist am Prozess der Sicherung genomische Integrität beteiligt, an der homologen Replikation sowie an der DNA “cross-link repair“. BRIP1 kann Reparaturproteine von der geschädigten DNA entfernen und so die Replikationsgabel stabilisieren. Es interagiert mit MLH1, einem mismatch Protein sowie mit FANCA, die sich an der DNA damage site befinden. Zusammen können sie Teile der DNA entwinden und geschädigte Replikationsgabeln reparieren (Peng et al. 2007).

Das Protein BRIP1 ist DNA Helikase und ATPase zugleich. Es ist in der Lage die zwei Stränge der DNA Doppelhelix zu entwinden und sie somit für Reparaturproteine (BRCA1) zugänglich zu machen (Ouhtit et al. 2016).

Wie das BRCA1 Gen ist auch BRIP1 ein Tumorsuppressorgen. Zellen denen BRIP1 fehlt, sind nicht imstande, Doppelstrangbrüche zu reparieren. Ein fehlendes BRIP1 macht Zellen anfällig für ionisierende Strahlen und cross links innerhalb der DNA.

### **3 Fragestellung**

- 1) Ist es immunhistochemisch möglich BRCA1 und/oder BRCA2-mutierte Ovarialkarzinome zu detektieren?
- 2) Falls ja, eignet sich ein einzelner ausgesuchter Antikörper oder ist ein Panel zur Untersuchung von BRCA mutierten Ovarialkarzinomen nötig?
- 3) Welche Rolle spielt es für die Expression des Proteins, ob die Mutation auf dem BRCA1-Gen, dem BRCA2-Gen oder auf beiden liegt? Zeigen BRCA1/2-Mutationen unterschiedliche Proteinexpressionen?
- 4) Gibt es eine Korrelation zwischen der Proteinexpression und der Signifikanz der Mutationen Gruppe 1-5 (Einteilung Tabelle 9)? Kann das Protein- Panel nur signifikante/wahrscheinlich signifikante Mutationen detektieren oder auch die restlichen Gruppen?
- 5) Gibt es Unterschiede im Expressionsprofil innerhalb des ausgesuchten Panels in Korrelation zur Lokalisation der Mutation?
- 6) Korreliert das Alter der Patientin mit der Proteinexpression?

### **4 Material und Methoden**

#### **4.1 Patientenkollektiv**

Für diese Arbeit wurden zwei separate Patientenkollektive verwendet. Das erste beinhaltet 206 Fälle, welche von April 2016 bis November 2017 am pathologischen Institut der LMU München erhoben wurden und entstammt dem täglichen Eingang des Pathologischen Institutes. Dieses Kollektiv besteht aus HGSOVCA-Routinefällen welche aufgrund einer positiven Familienanamnese (spezifische Kriterien) einer BRCA-Mutationsanalyse unterzogen wurden. Es handelt sich bei allen Fällen um hig-grade (G3 und G4) seröse Ovarialkarzinomen, welche mit Cisplatin vorbehandelt wurden. Daten zum Überleben und möglichen Todesursachen sind nicht bekannt.

Das zweite Kollektiv ist ein TMA (Tissue Micro Array) Kollektiv, zu dem die Daten zu Altersverteilung, histologischem Subtyp, FIGO-Stadium, Grading und Follow up bereits vorlagen. Die 299 Fälle waren auf zehn TMA- Blöcke verteilt. Dieses Kollektiv besteht

aus OVCA-Fällen, welche alle einen unbekannten BRCA Mutationsstatus aufweisen. Alle Patientinnen dieses Kollektivs wurden aufgrund der Diagnose eines OVCA unterschiedlicher histologischer Klassifikation an der LMU München in den Jahren 2003-2006 operiert.

Im Folgenden werden getrennt für beide Kollektive relevante Daten der deskriptiven Statistik dargestellt.

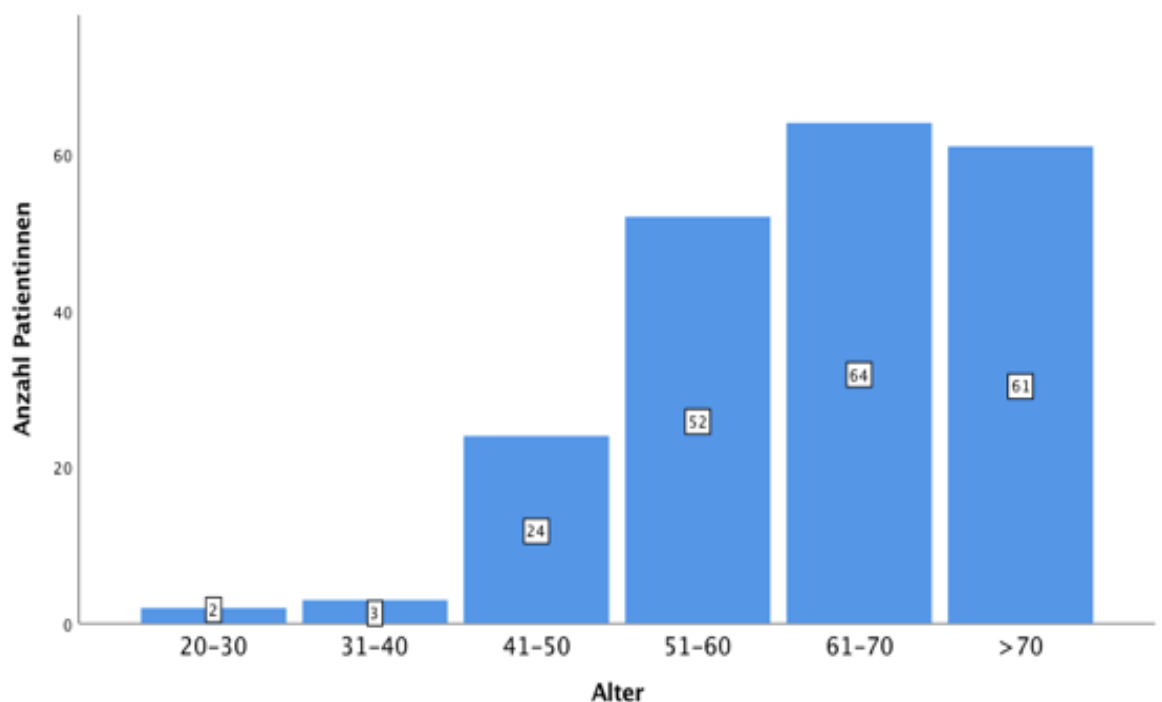
## 4.2 Übersicht Patientenkollektiv

### 4.2.1 HGSOVCA-Kollektiv

Es wurden insgesamt 206 Fälle mit BRCA-Mutationsstatus aufgenommen, die dem täglichen Eingang des Pathologischen Instituts der LMU München entstammen.

Die Patientinnen befanden sich zum Zeitpunkt der Mutationsanalyse in einem Alter zwischen 25 und 82 Jahren. Der Mittelwert liegt bei 62,98 Jahren, die Standardabweichung bei 11,241.

Nachfolgendes Balkendiagramm gibt einen Überblick über die Altersverteilung des Gesamtkollektivs.



Gesamt	206
Mittelwert	62,98
Median	63,50
Std.- Abweichung	11,241
Varianz	126,365

Tabelle 8: Altersverteilung Patientenkollektiv

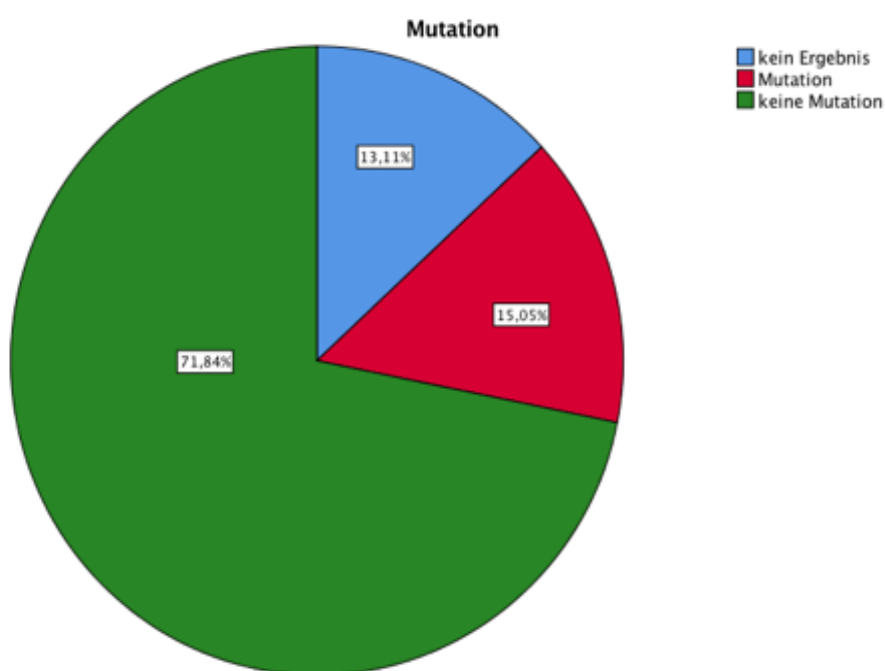
Neben Alter und Geburtsjahr ist die Klassifizierung der Mutation für jeden Fall mittels der Software „PathoPro“ im Pathologischen Institut ermittelt wurden. Nach der International Agency for Research and Cancer (IARC) Klassifikation lässt sich der genetische Befund in 5 Klassen einteilen: (Plon et al. 2008)

Klasse	Bedeutung
<b>I</b>	Nicht pathogen, keine klinische Signifikanz
<b>II</b>	Wahrscheinlich nicht pathogen, kaum klinische Signifikanz
<b>III</b>	Unklar, VUS (variant of uncertain significance)
<b>IV und V</b>	Definitiv pathogen, klinisch signifikant

Tabelle 9: Klassifizierungssystem für Sequenzvarianten, die per NGS nachgewiesen wurden, Einteilung nach IARC in fünf Klassen

Um die gesammelten Daten zu kategorisieren, wurde die Einteilung nach IACR in dieser Arbeit wie folgt integriert. Fälle, in denen Mutationen in den BRCA-Genen gefunden wurden, diese aber Klasse 1 (klinisch nicht signifikant) zugeordnet worden, sind als „keine (klinisch signifikante) Mutation“ mit der Kategorie 2 vermerkt. Kategorie 1 beinhaltet die klinisch signifikanten Mutationen, die nach IACR die Klassen 3-5 fallen. Kategorie 0 beinhaltet jene Fälle ohne Ergebnis. Hier konnte in der Mehrzahl der Fälle aufgrund von mangelnder DNA Qualität keine NGS-Analyse durchgeführt werden.

Einen Überblick über die Codierung aller Fälle gibt folgende Tabelle:



	Häufigkeit	%	Gültige %	Kumulierte %
0	27	13,1	13,1	13,1
1	31	15,0	15,0	28,2
2	148	71,8	71,8	100
Gesamt	206	100	100	

Tabelle 10: Prozentuale Verteilung aller Fälle mit Mutation, ohne Mutation und ohne Ergebnis

Nachfolgend exemplarisch die Aufnahme der Mutationsfälle in der Excel Tabelle:

Fallnummer Mutation	Alter	Gen	Klasse
1	60	1	5
2	52	1	5
3	74	1	5
4	63	2	5

<b>5</b>	65	2	3 (4)
<b>6</b>	75	2	3 (4 und 5)
<b>7</b>	72	1	5
<b>8</b>	52	1	5
<b>9</b>	80	2	5
<b>10</b>	54	1	5
<b>11</b>	57	1	5
<b>12</b>	73	2	4
<b>13</b>	56	2	5
<b>14</b>	59	2	5
<b>15</b>	55	2	3 (4)
<b>16</b>	62	1	4
<b>17</b>	69	2	4
<b>18</b>	72	2	4
<b>19</b>	82	2	4
<b>20</b>	42	1	4
<b>21</b>	81	2	4
<b>22</b>	53	1	4
<b>23</b>	62	2	4
<b>24</b>	76	2	4
<b>25</b>	74	1	4
<b>26</b>	63	2	4
<b>27</b>	51	1	4
<b>28</b>	80	2	4 oder 5
<b>29</b>	74	1	5
<b>30</b>	64	1	3 (5)
<b>31</b>	57	2	5

Tabelle 11: Übersicht über die Fälle mit klinisch signifikanter Mutation aus dem Gesamtkollektiv

Ebenfalls durch die Software PathoPro ersichtlich und aufgenommen wurde der Ort der genetischen Veränderung auf dem BRCA-Gen. Mutationen können auf dem BRCA1-Gen, BRCA2-Gen oder beiden Genen (BRCA1- und BRCA2-Gen, hier als Kategorie 3 vereinfacht) vorkommen. Die Gruppe mit Veränderungen auf beiden Genen stellt die



Größe dar, Gruppe 0 konnte aus o.g. Gründen technisch nicht analysiert werden. Da bei diesen Patientinnen keine Aussage zum Mutationsstatus gemacht werden kann, zählen sie zur Kategorie „kein Ergebnis“ und wurden für die immunhistochemischen Färbungen im Vorfeld ausgeschlossen. Im Folgenden ist die prozentuale Verteilung der Mutationen in den Genen dargestellt.

Gen	Häufigkeit	Prozent
<b>0</b>	27	13,1 %
<b>1</b>	16	7,7%
<b>2</b>	59	28,6 %
<b>3</b>	104	50,5%
<b>Gesamt</b>	<b>206</b>	<b>100%</b>

Tabelle 12: Prozentuale Verteilung auf die BRCA-Gene 1 und 2

Fallanzahl	Mutationsstatus	Mutationskategorie in dieser Arbeit	Gen
206	-Mutation 31 Fälle	Kategorie 2 bestehend aus folgenden Klassen nach IACR: Klasse 3 (VUS) :4 Fälle Klasse 4 (pathogen) :13 Fälle Klasse 5 (pathogen) :14 Fälle	BRCA1: 14 Fälle BRCA2: 17 Fälle BRCA1 und 2: 0 Fälle
	-Keine Mutation 148 Fälle	Kategorie 1	BRCA1: 2 Fälle BRCA2: 42 Fälle BRCA1 und 2: 104 Fälle
	-Kein Ergebnis 27 Fälle	Kategorie 0	

Tabelle 13: Übersicht über das Gesamtkollektiv

#### 4.2.2 TMA- Kollektiv

Für die vorliegende Arbeit wurde TMA mit 299 OVCA verwendet. Die klinischen Daten wurden vom Tumorregister München zur Verfügung gestellt. Alle Patientinnen wurden zwischen 2003 und 2006 mit einem OVCA diagnostiziert und erhielten an der LMU München eine operative Therapie. Zum Zeitpunkt der Diagnose waren die Patientinnen zwischen 23 und 93 Jahren. Der Mittelwert und der Median lagen bei 61 Jahren, die Standardabweichung betrug 12,07 Jahre.

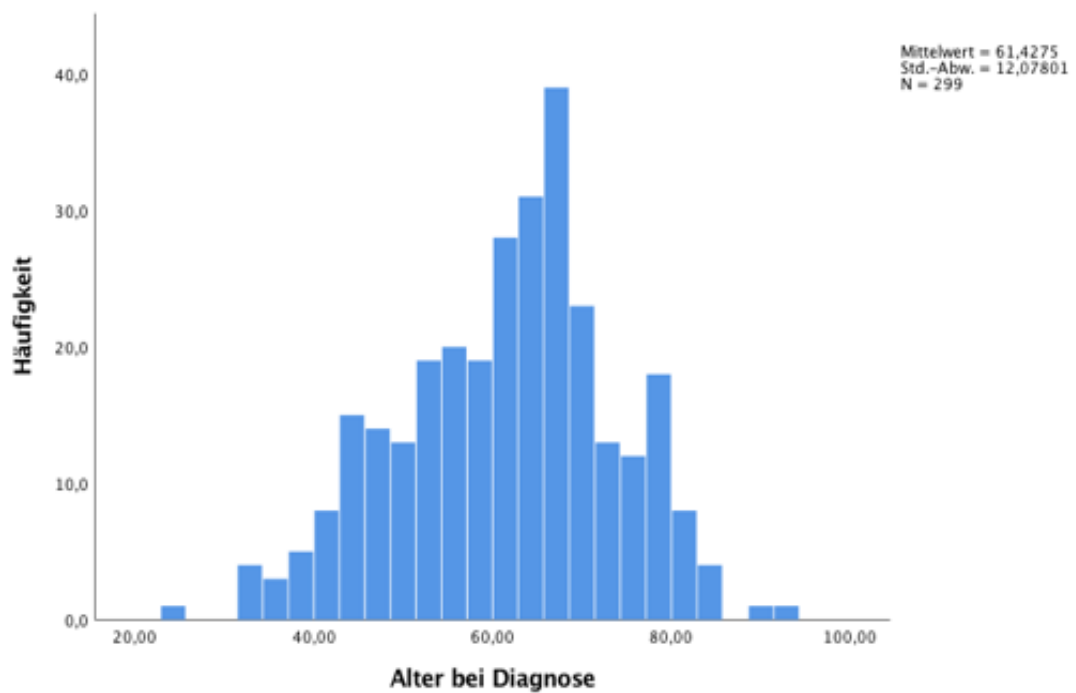


Abbildung 13: Altersverteilung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung

Zu allen Fällen lagen Daten zum Grading sowie zum FIGO-Stadium vor. 81,61 % der Patientinnen hatten einen schlecht differenzierten Tumor, 8,36% einen mäßig differenzierten und 10,03 % einen gut differenzierten Tumor.

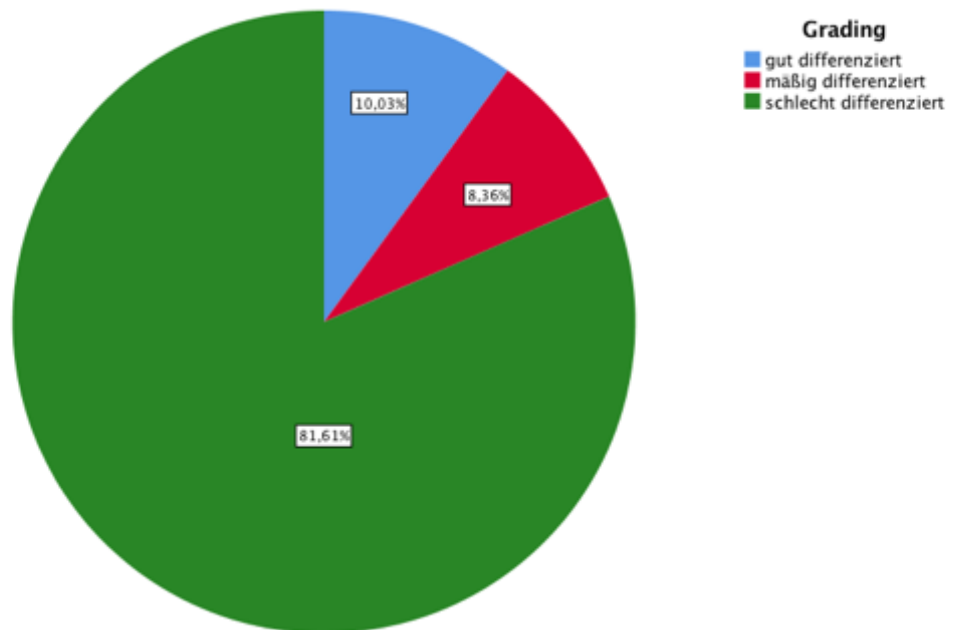


Abbildung 14: Prozentuale Verteilung Grading

Bei den FIGO Stadien wurden 10,7% der Patientinnen mit einem FIGO Stadium I diagnostiziert, 7,36% mit einem FIGO Stadium II, 15,72 % mit einem FIGO Stadium III und 66,22 % mit einem FIGO Stadium IV. Bei genauerer Betrachtung der FIGO Stadien weiter unterteilt in die Untergruppen A, B und C ist bei unter einem Prozent der Fälle die genaue Zuteilung nicht bekannt.

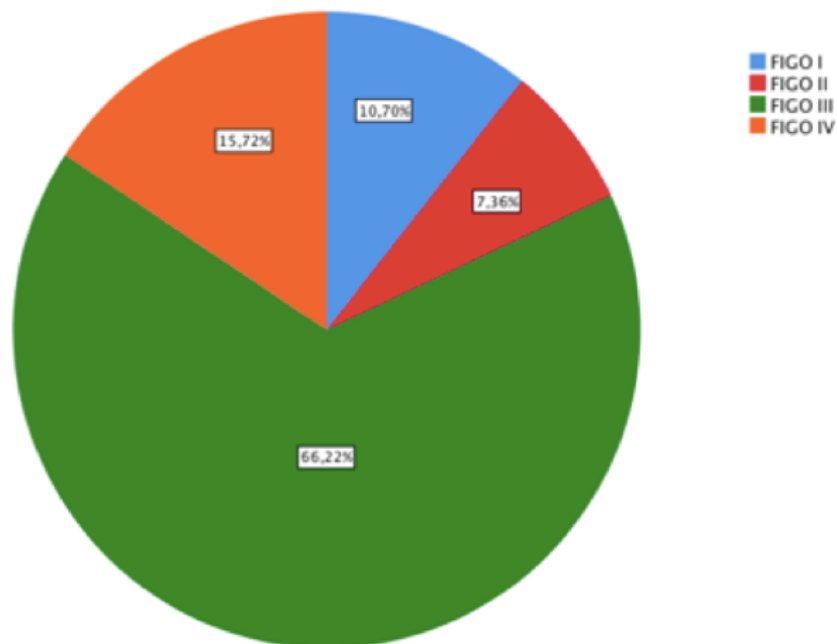


Abbildung 15: Prozentuale Verteilung der FIGO Stadien

Die histologische Verteilung der Fälle zeigt, dass bei dem Großteil der Patientinnen ein seröses OVCA vorlag (G1 und G3). Zweithäufigste Gruppe stellen die endometrioiden Karzinome dar, die restlichen histologischen Typen waren jeweils mit geringer Fallzahl vertreten, wie die folgende Tabelle 14 wiedergibt:

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
<b>serös G1</b>	19	6,4	6,4	6,4
<b>serös G3</b>	228	76,3	76,3	82,6
<b>endometrioid</b>	23	7,7	7,7	90,3
<b>muzinös</b>	13	4,3	4,3	94,6
<b>klarzellig</b>	4	1,3	1,3	96,0
<b>undifferenziert</b>	8	2,7	2,7	98,7
<b>seromuzinös</b>	4	1,3	1,3	100
<b>Gesamt</b>	<b>299</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	

Tabelle 14: Übersicht histologische Verteilung der Fälle

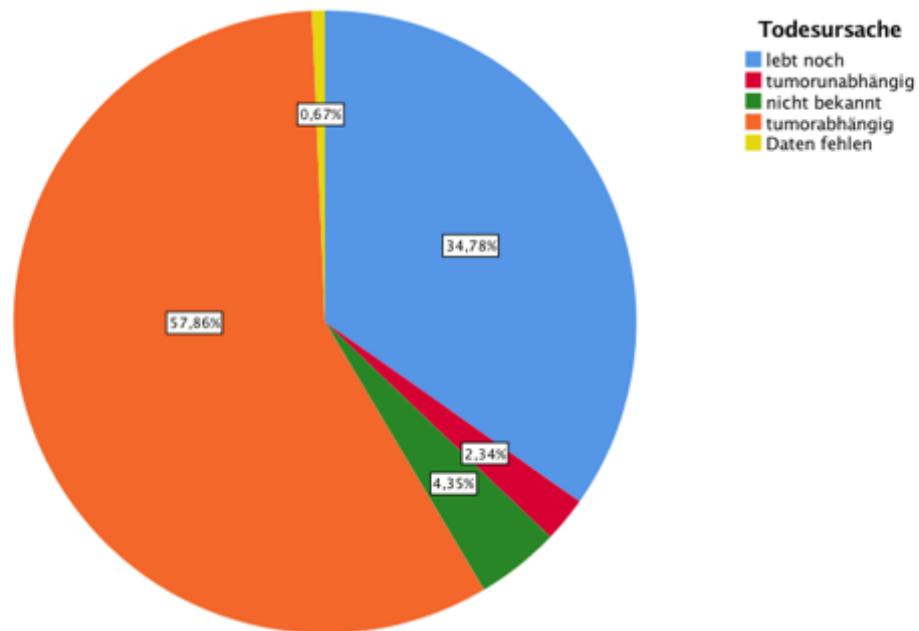


Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der Todesursache

Laut Tumorregister leben 34,78% der Patientinnen noch, die restlichen Patientinnen sind entweder tumorabhängig oder tumorunabhängig verstorben. Tumorabhängig verstarben 57,86% der verstorbenen, bei 0,67% lagen keine Daten vor.

### 4.3 Untersuchungsmaterial

Von allen 206 Fällen des HGSOVCA- Kollektivs standen Paraffinblöcke mit Anteilen des Tumorgewebes zur Verfügung. Jeweils ein bis zwei Schnitte mit positivem BRCA-Status sowie mit negativem BRCA-Status wurden vorab mit einer HE- Färbung angefärbt um die Lokalisation des Tumors auf dem Schnitt einschätzen zu können. Die immunhistochemischen Färbungen HSPC142, BAP1, BAAT1 und FANCI und CtIp wurden per Hand im Labor der Frauenklinik der LMU München, Campus Innenstadt durchgeführt.

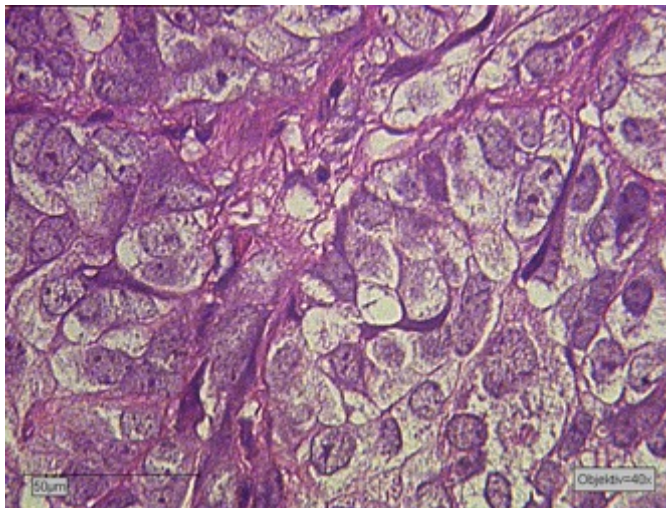


Abbildung 17: HE, Fall 20, 400-fache Vergrößerung high-grade seröses OVCA, BRCA-positiv

Die fünf immunhistochemischen Färbungen sind lediglich mit einer Auswahl an Schnitten der Gesamtkollektive angefertigt worden. Aus dem HGSOVCA Kollektiv von 206 Fällen wurden die ersten zwanzig Fälle mit nachgewiesener Mutation herausgesucht und mit zwanzig nicht- mutierten Fällen aus dieser Gruppe (Klasse 1 und 2) nach Alter und FIGO Stadium gematcht und mit den oben genannten fünf Antikörpern immunhistochemisch gefärbt.

Aufgrund der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit dem CtIp Antikörper am HGSOVCA Kollektiv wurde diese einzelne Färbung auch am TMA durchgeführt. Das TMA Kollektiv (299 Stanzen auf 10 Blöcke) wurde mit dem CtIp Antikörper im Labor des Pathologischen Instituts der LMU gefärbt.

#### 4.3.1 Geräte, Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Alle verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien sowie die Detektionskits standen entweder in der Frauenklinik oder im Pathologischen Institut zur Verfügung. Eine Übersicht erfolgt in nachstehender Tabelle.

<b>Geräte</b>	<p>-<i>Pipetten</i>: Eppendorf Research, Eppendorf, Hamburg, Deutschland</p> <p>-<i>Pipettenspitzen</i>: Eppendorf Standard, Eppendorf, Hamburg, Deutschland</p> <p>-<i>Lichtmikroskop</i>: Leitz, Wetzlar, Germany plus Kamera JVC 3CCD, color video camera und DISKUS Programm</p>
<b>Verbrauchsmaterial</b>	<p>-<i>Objektträger</i>: TOMO Adhäsionsobjektträger 75,3x25,3x1mm, R. Langenbrink GmbH, Emmendingen, Deutschland</p> <p>-<i>Deckgläser</i>: MENZEL Gläser, 24x60 mm, Menzel GmbH&amp;CoKG, Braunschweig, Deutschland</p> <p>-<i>Eindeck-Kitt</i>: Roti-Mount, Xylol-und tulölfreies Eindeckmedium für die Mikroskopie, Carl Roth GmbH&amp; CoKG, Karlsruhe, Deutschland</p> <p>-<i>Pipetten und Pipettenspitzen</i>: s.o.</p>
<b>Chemikalien</b>	<p>-<i>Roticlear</i>: Carl Roth GmbH &amp;CoKG, Karlsruhe, Deutschland</p> <p>-<i>Ethanol (99%)</i>: SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach, Deutschland</p> <p>-<i>Ethanol (96%, 70% und 50%)</i>: CLN GmbH, Chemikalien und Laborbedarf, Niederhummel, Deutschland</p> <p>-<i>Aqua dest.</i>: Friedrich Noll, München, Deutschland</p> <p>-<i>H2O2</i>: VWR Chemicals Prolabo, Frankreich</p> <p>-<i>Methanol</i>: J.T. Baker, Avantor Performance Materials Poland S.A., Niederlande</p> <p>-<i>Hämalaun</i>: Waldeck GmbH &amp;COKG, Münster, Deutschland</p>

	<p>-<i>Chromogensystem</i>: DAB (Dako Antibody Diluent with background reducing components), Dako North America, CA, USA</p> <p>-<i>PBS</i>: 450g NaCl, Sigma, München, Deutschland  71,65g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Merck, Darmstadt, Deutschland  13,35 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merck, Darmstadt, Deutschland  5000 ml Aqua dest., Friedrich Noll, München, Deutschland</p> <p>-<i>Steriles PBS</i>: Dulbeco, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland</p> <p>-<i>Citratpuffer</i>:</p> <p>Lösung A:  21,01g 0,1 M Citronensäure-Monohydrat, Merck, Darmstadt, Deutschland in 1l Aqua dest. plus</p> <p>Lösung B:  29,41g Natrium-Citrat, Merck, Darmstadt, Deutschland in 1l Aqua dest.</p>
<b>Detektionssystem</b>	<p>Zytomed Systems, Berlin</p> <p>Zytochem Plus HRP Polymer Systems (Mouse/Rabbit), 3x 100 ml</p>
<b>Antikörper</b>	<p>-<i>BRCA1 (C-Terminal)</i>, Abcam, Cambridge, UK Lot: GR13104-4</p> <p>-<i>Phospho-BRCA1</i> (phospho S 1423), Abcam, Cambridge, UK Lot: GR64453-2</p> <p>-<i>HSPC 142</i>: Abcam, Cambridge, UK Lot:GR212614-1</p> <p>-<i>BAP1</i>: LS Bio, Seattle, WA, USA, Lot: 53428</p> <p>-<i>FANCI</i>: Novus Biologicals, Littleton, CO, USA Lot: A-2</p> <p>-<i>CtIp</i>: Abcam, Cambridge, UK Lot: GR110597-4</p> <p>-<i>BAAT1</i>: Novus Biologicals, Littleton, CO,USA, Lot:A-1</p>

Tabelle 15: Übersicht über verwendete Materialien

## **4.4 Immunhistochemie**

### **4.4.1 Allgemeines**

Immunhistochemische Methoden ermöglichen den spezifischen Nachweis bestimmter zellulärer Antigene, gegen die Antikörper gebildet werden. Das Grundprinzip der Immunhistochemie zur Bestimmung der zu untersuchenden Antigene ist die Antigen-Antikörper Reaktion. Das Prinzip dieser Reaktion beruht auf der Affinität spezifischer Antikörper zu bestimmten Oberflächenbereichen der Antigene, den Epitopen. Der Antikörper bindet sein Epitop.

Die gebundenen Antikörper werden direkt oder indirekt an ein Farbdetektionssystem gekoppelt, um das Antigen durch einen Farbumschlag sichtbar zu machen. Damit kann nicht nur gezeigt werden, ob das Protein in der Zelle vorhanden ist, sondern auch die Lokalität bestimmt werden (nukleär, cytoplasmatisch, membranös oder auch in mehreren Kompartimenten).

Über die Auswertung der Signalstärke kann die Expression des jeweiligen Antigens in dem untersuchten Gewebe bei entsprechender Standardisierung quantitativ bestimmt und ausgewertet werden.

### **4.4.2 Detektionssysteme**

Bevor der Antikörper auf den Gewebeschnitt aufgebracht werden kann, sind mehrere Vorbereitungen nötig. Der Antikörper muss einwandfrei in das zu untersuchende Gewebe eingebracht werden können und die Bindung des Antikörpers an sein Antigen sollte möglichst sehr spezifisch sein, damit beim Auswerten eine klare Aussage bezüglich der Expression des Antikörpers (Farbumschlages) getroffen werden kann. Da es sich um Paraffinschnitte handelt, wird zunächst das Paraffin aus den Schnitten gelöst: 20-minütiges Entparaffinieren durch Xylol. Im nächsten Schritt müssen endogene Enzyme blockiert werden, die das Antigen sichtbar machen und so zu einer falsch positiven Farbreaktion führen könnten. Bei den hier verwendeten Färbungen wurde zur Blockierung zwanzig Minuten in Wasserstoffperoxid inkubiert.

Bei der initialen Fixation des Gewebes kommt es zu einer Vernetzung der Proteine (Aldehydvernetzung). Diese spielt im nächsten Schritt eine wichtige Rolle, denn damit der Antikörper sein Epitop erkennt muss dieses von der Aldehydvernetzung befreit, „demaskiert“ werden. Diese Proteolyse wird durch Erhitzen mit Citratpuffer in einem Schnellkochtopf wieder aufgehoben.



In dieser Arbeit wurde zur Detektion des gebundenen Antikörpers eine spezifische Methode angewandt, die Hintergrundfärbung durch unspezifische Bindung des Primär- und Sekundärantikörpers im HRP-Polymer durch die Inkubtion einer Blockierungslösung minimiert: ZytoChem- Plus HRP-Polymer-Methode.

Das Zytochem-Plus Polymer Kit besteht aus drei Komponenten: einer Blocking-Solution, einem Post Block Reagent und dem HRP-Polymer. Dieses Enzym Polymer enthält mehrere Moleküle Sekundärantikörper die kovalent mit mehreren Molekülen Meerrettich-Peroxidase (Horse Raddish Peroxidase, HRP) verbunden sind.

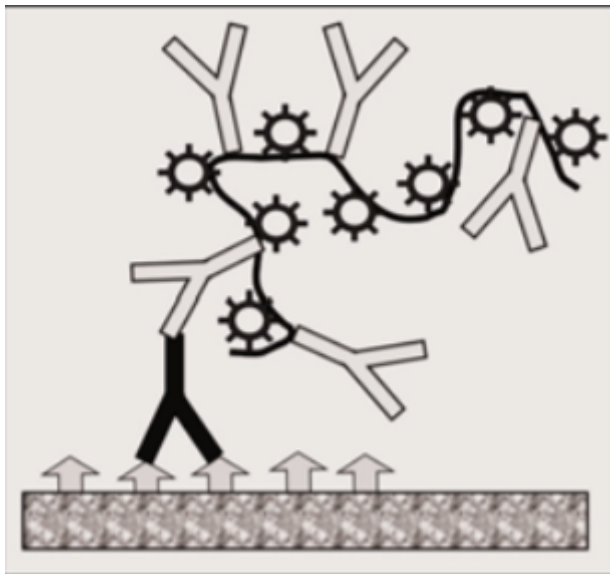


Abbildung 18: Darstellung der Zwei-Schritt-Polymer-Methode, aus Histotechnik-Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik, Kapitel Immunhistochemie S. 279 ff von Gudrun Lang (Immunhistochemie 2006)

Der Ablauf sieht wie folgt aus: Die Färbung erfolgt mit der Zwei-Schritt-Polymer-Methode, die eine neuere Entwicklung der indirekten Methode darstellt. Der Primärantikörper bindet sein Epitop. Die enzymmarkierten Sekundärantikörper sind an mehrere Rückgrat Moleküle aus Polymer gebunden. Nun folgt die Hinzugabe eines Chromogens, welche mit der Peroxidase eine enzymatische Reaktion eingeht und am Ort der Bindung des Primärantikörpers ein Niederschlag bildet, welcher im Lichtmikroskop sichtbar ist.

Das Enzym ist in der Lage die Reaktion von Wasserstoffperoxid und Elektronen zu Wasser und Sauerstoff zu katalysieren. Als Elektronendonator fungiert das im nächsten Schritt verwendete DAB (3,3'-Diaminobenzidin). Dieses Chromogen verfärbt sich nach Oxidation rotbraun und ist lichtmikroskopisch gut erkennbar.

Anschliessend wird die Färbung einer Gegenfärbung unterzogen (Hämalaun nach Mayer) und mit Eukitt eingedeckt.

#### **4.4.3 Durchführung/ Ablauf**

Die immunhistochemischen Färbungen mit HSPC 142, BAP1, BAAT1 und FANCI wurden händisch im immunhistochemischen Labor der LMU Frauenklinik, Maistrasse 11 angefertigt. Für die Färbung diente folgendes Färbeprotokoll:

1. Entparaffinieren für 20 min. in Roticlear
2. in 100 % Ethanol schwenken
3. Blockierung der endogenen Peroxidase: 20 Minuten 6ml 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 200 ml Methanol
4. in 100%, 70% und 50% Ethanol schwenken
5. Aqua dest.
6. Demaskierung mit Citratpuffer im Schnellkochtopf: Der Schnellkochtopf wurde mit der zuvor frisch angesetzten Lösung zum Kochen gebracht, erst dann wurden die Schnitte eingestellt. Nach Verschließen des Deckels und weiteren fünf Minuten wurde der Topf im Waschbecken zum Abdampfen abgestellt, um nun Leitungswasser zum Puffer laufen zu lassen. Danach in Aqua dest. spülen und in PBS waschen. Der Citratpuffer besteht aus Lösung A: 21,01g 0,1M Citronensäure plus 1 Liter Aqua dest. und Lösung B: 29,41g 0,1M Na- Citrat plus 1 Liter Aqua dest. Die Gebrauchslösung bestand aus 18ml Lösung A plus 82ml Lösung B plus 900 ml Aqua dest.
7. Blockierung der elektrostatischen Ladungen: Inkubation im Blockierungsserum (Reagent1) für 5 Minuten (Zytochem Plus HRP Polymer System)
8. Primärantikörper in seiner jeweiligen Verdünnung 16 Stunden über Nacht bei 4 Grad inkubieren (Anti-HSPC 142: Verdünnung 1:400 in sterilem PBS, Anti-BAP1: Verdünnung 1:300 in sterilem PBS, Anti-FANCI: Verdünnung 1:300 in sterilem PBS, Anti-CtIp: Verdünnung 1:300 in sterilem PBS, Anti-BAAT1: Verdünnung 1:100 in sterilem PBS)
9. Waschen in PBS für 5 Minuten.

10. Post- Block für 20 Minuten (Reagent 2): Verstärkungsreagenz und wiederholt 5 Minuten in PBS waschen
11. HRP Polymer (Reagent 3) für 30 Minuten, danach 5 Minuten in PBS waschen
12. Substratfärbung mit DAB (3,3 Doaminobenzidin von Dako: 1ml Substratpuffer plus 1 Tropfen DAB Chromogen. Start der enzymatischen Reaktion mit der Peroxidase
13. 5 Minuten Aqua dest. um Farbreaktion zu stoppen
14. Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer
15. 5 Minuten in Leitungswasser bläuen, dient dem Herauswaschen der Säurereste
16. Aufsteigende Alkoholreihe bis Roticlear
17. Eindecken mit Roti- Mount

Aufgrund von stärkerer Hintergrundfärbung wurde eine erneute Färbung mit CtIp an den vorherigen vierzig Schnitten im Labor des pathologischen Instituts der LMU händisch angefertigt. Zeitgleich wurde mit dem gleichen CtIp Antikörper das TMA BRCA-Kollektiv bestehend aus 299 Fällen gefärbt. Folgendes Kurzprotokoll gibt eine Übersicht:

#### Protokoll zu CtIP

Firma: Thermo Fisher

Cat. No.: PA5-20963

Ablauf:

- Vorbehandlung: Hitzevorbehandlung mit Target Retrieval Solution (Fa. Agilent Technologies, Cat.No. S1699)
- Inkubation Primärantikörper: 60 min RT, Verdünnung 1:100
- Detektionssystem: ImmPress Reagent Kit Anti-Rabbit IgG (Fa. Vector, Cat. No. MP-7401)
- Chromogen: AEC+ (Fa. Agilent Technologies, Cat.No. K3469)
- Gegenfärbung: Hematoxylin Gill's Formula (Fa. Vector, Cat. No. H-3401)

#### 4.4.4 Auswertung

Alle immunhistochemisch gefärbten Objektträger wurden lichtmikroskopisch bei 250- und 400-facher Vergrößerung ausgewertet (Leitz, Wetzlar) sowie ausgewählte Fälle aus den Kollektiven digital fotografiert (JVC, Japan). Jeder Fall wurde nach einem vorgeschlagenen Graduierungssystem nach Remmele und Stegner bewertet und die

erhobenen Daten in eine Excel Tabelle überführt. Für die statistische Auswertung der Daten wurde die Excel Tabelle in SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Version 25) übertragen.

#### 4.4.4.1 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung erfolgte nach dem Immunreaktiven Score (IRS) nach Remmele und Stegner. Initial wurde dieses Bewertungssystem für die Quantifizierung von Östrogen- und Progesteronrezeptoren auf der Oberfläche der Tumorzellen beim Mammakarzinom etabliert (immunhistochemischer Immunrezeptornachweis). Da zu keiner der in dieser Arbeit verwendeten fünf Färbungen ein etabliertes Scoring System bezüglich der immunhistochemischen Auswertung vorliegt, wurde sich am IRS Score nach Remmele und Stegner orientiert, um die Expression der Proteine zu untersuchen. Pro Fall wurde die Proteinexpression im Zytoplasma sowie im Kern jeweils mit dem IR-Score sowie mit dem Prozentsatz positiver Zellen festgehalten.

Prozentsatz positiver Zellkerne	Farbintensität	Score
keine positiven Kerne: 0 Punkte	keine Farbreaktion: 0 Punkte	Punkte Prozentsatz positiver Zellkerne x Punkte Farbintensität (0 – 12 Punkte)
< 10 % positive Kerne: 1 Punkt	schwache Farbreaktion: 1 Punkt	
1 – 50 % positive Kerne: 2 Punkte	mittelstarke Farbreaktion: 2 Punkte	
51 – 80 % positive Kerne: 3 Punkte	starke Farbreaktion: 3 Punkte	
> 80 % positive Kerne: 4 Punkte		

Tabelle 16: Auflistung der Bestandteile zur Berechnung des immunhistochemischen Scores nach Remmele und Stegner (1987)

Der IRS Score ist wie in Abbildung 6 dargestellt das Produkt aus dem Prozentsatz positiver Zellkerne (PpZ, 0-4) und der Farbintensität (0-3). Der Score kann somit Zahlen zwischen 0 bis 12 abdecken. Anschließend wurde vereinfachend definiert, dass eine negative Expression bei einem IR Score von 0-2 und eine positive Expression bei einem IR-Score von 3-12 vorlag.

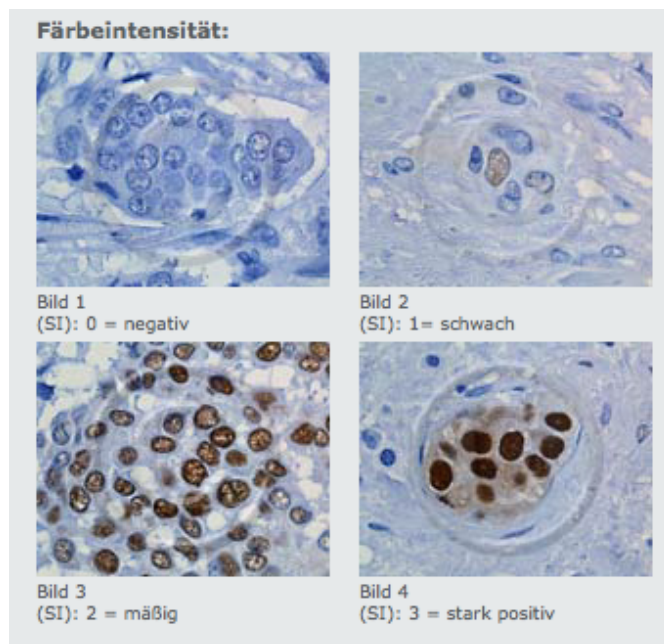


Tabelle 17: Beispiele zur Färbeintensität (Staining intensity) in aufsteigender Reihenfolge angelehnt an (Remmele und Stegner 1987), aus: pathologie-vechta.de, abgerufen am 18.09.2017.

#### 4.4.4.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS Version 25 und der Unterstützung des IBE München durchgeführt.

Für die deskriptive Statistik wurde bei Berechnungen von Häufigkeiten und Kreuztabellen der Chi-Quadrat Test verwendet. Da dieser Test das Vorhandensein von Zellen mit einer erwarteten Häufigkeit von  $>5$  voraussetzt, wurde in entsprechenden Fällen auf den Exakten Test nach Fisher zurückgegriffen. Ein p- Wert von  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

Für Zusammenhänge zwischen den fünf Antikörpern jeweils in der Expression zytoplasmatisch und nukleär für BRCA- negative und BRCA- positive Fälle sowie für den PpZ wurden aufgrund von nicht vorhandener Linearität zwischen den Daten statt dem Pearson Korrelationskoeffizienten jeweils Boxplots mit Berechnung des Median durchgeführt und diese verglichen. Anhand dessen wurde gezielt mit Kreuztabellen und Chi- Quadrat Test auf signifikante Zusammenhänge überprüft.

Zur Berechnung des Überlebens wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven durchgeführt. Die Signifikanz wurde durch Log-Rank-Tests überprüft.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Ergebnisse und Auswertung der Immunhistochemie

Im Folgenden werden die Ergebnisse der deskriptiven Statistik für jede Färbung des HGSOVCA-Kollektivs vorgestellt. Daran anschließend folgt die Korrelation der Färbungen untereinander sowie die am TMA-Panel durchgeführten Kaplan-Meier-Überlebensanalysen.

Von den vierzig Fällen des HGSOVCA-Kollektivs mit jeweils fünf Färbungen konnten alle 200 Färbungen (100%) ausgewertet werden. Die im Folgenden genannten Prozentzahlen beziehen sich entweder auf das gesamte Kollektiv ( $N = 40$ ) oder auf die mutierten bzw. nicht mutierten Fälle des Kollektivs ( $N = 20$ ). Bei der Auswertung des TMA-Panels mussten aufgrund von abgeschwommenem Tumorgewebe 41 Fälle (13,7%) gestrichen werden.

#### 5.1.1 Immunhistochemische Färbung HSPC142

In 38 von 40 Fällen (95%) lässt sich eine positive zytoplasmatische Expression des HSPC-Proteins nachweisen. Keine Expression zeigt sich in zwei mutierten Fällen (10% der mutierten). Eine positive nukleäre Expression findet sich insgesamt in einem mutierten Fall von 40 (2,5% der mutierten). Alle 20 Fälle des Kollektivs ohne Mutation zeigen keine nukleäre Expression. Nachfolgend der IR-Score von HSPC142 für beide Kollektive (Abbildung 20)

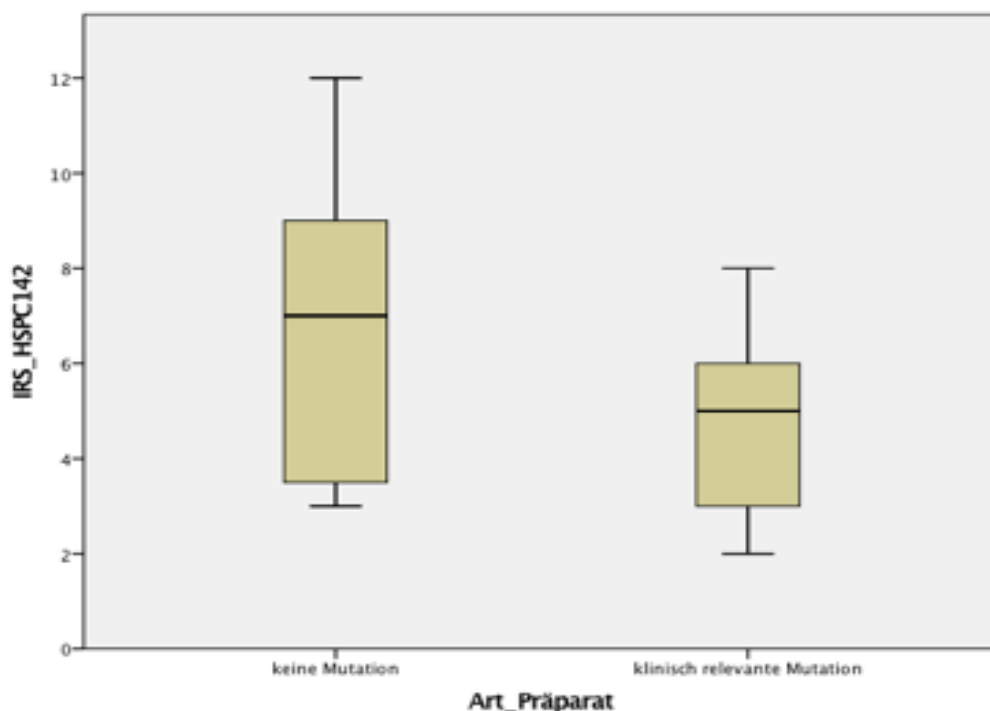


Abbildung 19: Vergleich des zytoplasmatischen IR-Scores von HSPC142 in mutierten und nicht mutierten Fällen

Sowohl eine zytoplasmatische als auch eine nukleäre Expression ergibt sich in einem Fall (KO16/1124, mutiert).

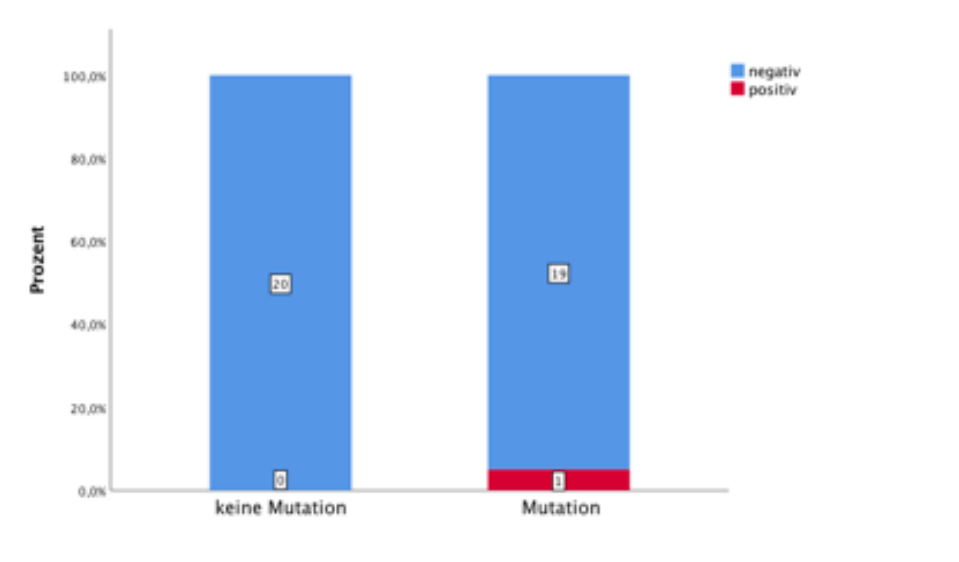


Abbildung 20: Verteilung der nukleären HSPC142-Expression

Der Prozentsatz positiver Zellen der HSPC142 Färbung verteilt sich wie folgt:

PpZ	2	3	4	Gesamt
<b>Keine Mutation</b>	0 (0%)	14 (70 %)	6 (30%)	20
<b>Mutation</b>	4 (20%)	14 (70%)	2 (10%)	20
<b>Gesamt</b>	4 (10%)	28 (70%)	8 (20%)	40

Tabelle 18: PpZ HSPC142 zytoplasmatisch

PpZ	0	1	2	3	Gesamt
<b>Keine Mutation</b>	18 (90%)	1 (5%)	1 (5%)	0 (0%)	20
<b>Mutation</b>	16 (80%)	3 (15%)	0 (0 %)	1 ( 5%)	20
<b>Gesamt</b>	34 (85%)	4 (10%)	1 ( 2,5%)	1 (2,5%)	40

Tabelle 19: PpZ HSPC142 nukleär



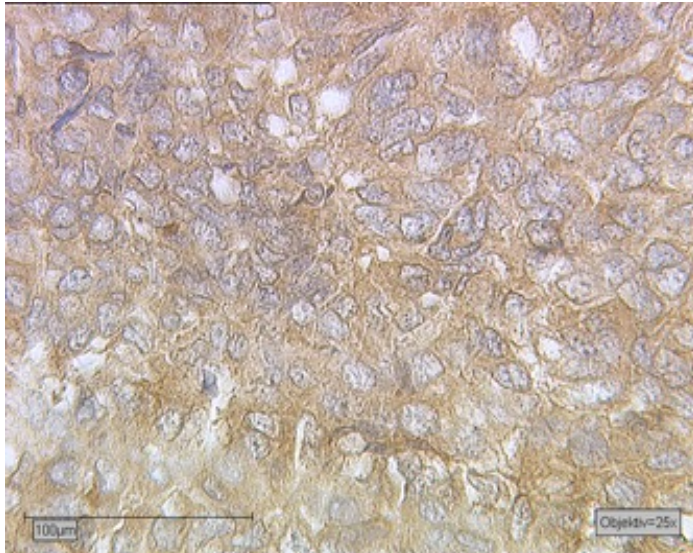


Abbildung 21: HSPC142, 250-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv ohne Mutation, IRS zytoplasmatisch = 6, keine nukleäre Expression

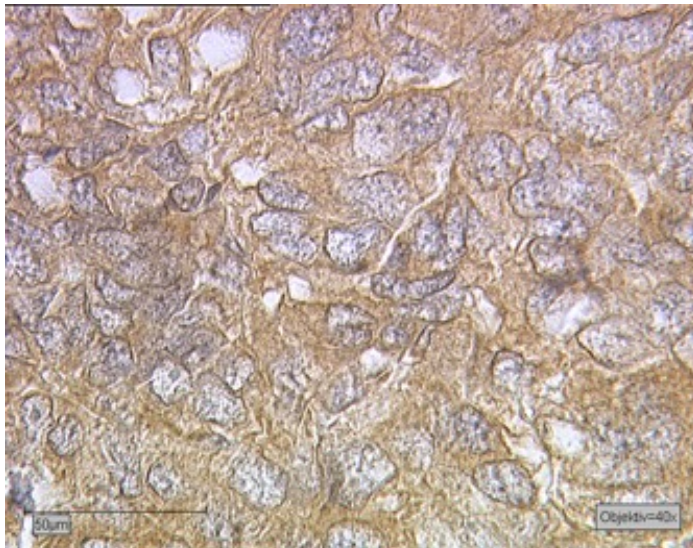


Abbildung 22: HSPC142, 400-fache Vergrößerung, IRS cytoplasmatisch = 6, keine nukleäre Expression



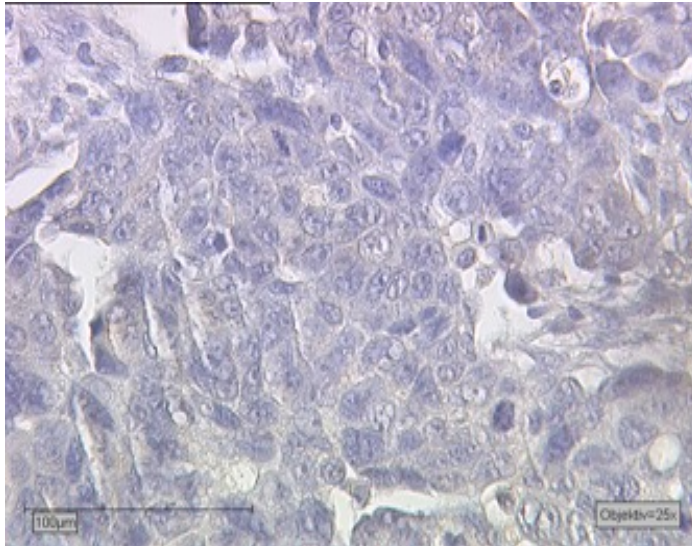


Abbildung 23: HSPC142, 250-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv mit Mutation, IRS zytoplasmatisch = 3, keine nukleäre Expression

### 5.1.2 Immunhistochemische Färbung BAAT1

Insgesamt zeigen 39 der 40 Fälle eine positive nukleäre Expression (97,5%). Lediglich ein mutierter Fall (5% der mutierten) weist keine Expression auf. Eine positive zytoplasmatische Expression findet sich bei 37 von 40 Fällen (92,5%), drei Fälle (15% der nicht mutierten) zeigen keine Expression. Sowohl eine Expression im Kern und im Zytoplasma zeigen 36 Fälle von allen insgesamt 40 Fällen. Lediglich vier Fälle exprimieren entweder im Zytoplasma oder im Kern.

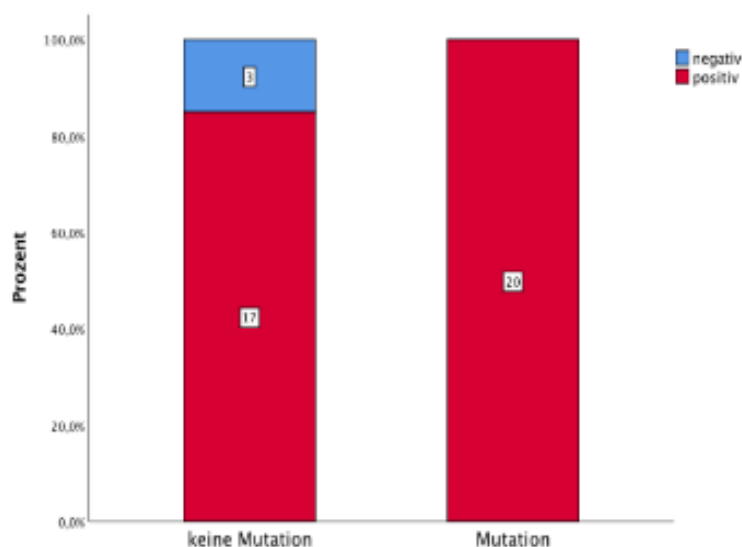


Abbildung 24: Verteilung der zytoplasmatischen BAAT1-Expression

Der Prozentsatz positiver Zellen der BAAT1 Färbung verteilt sich wie folgt:

PpZ	1	2	3	4	Gesamt
<b>Keine Mutation</b>	0 (0%)	2 (10%)	5 (25%)	13 (65%)	20
<b>Mutation</b>	1 (5%)	1 (5%)	5 (25%)	13 (65%)	20
<b>Gesamt</b>	1 (5%)	3 (15%)	10 (50%)	26 (65%)	40

Tabelle 20: PpZ BAAT1 nukleär

PpZ	2	3	4	Gesamt
<b>Keine Mutation</b>	5 (25%)	11 (55%)	4 (20%)	20
<b>Mutation</b>	1 (5%)	13 (65%)	6 (30%)	20
<b>Gesamt</b>	6 (15%)	24 (60%)	10 (25%)	40

Tabelle 21: PpZ BAAT1 zytoplasmatisch

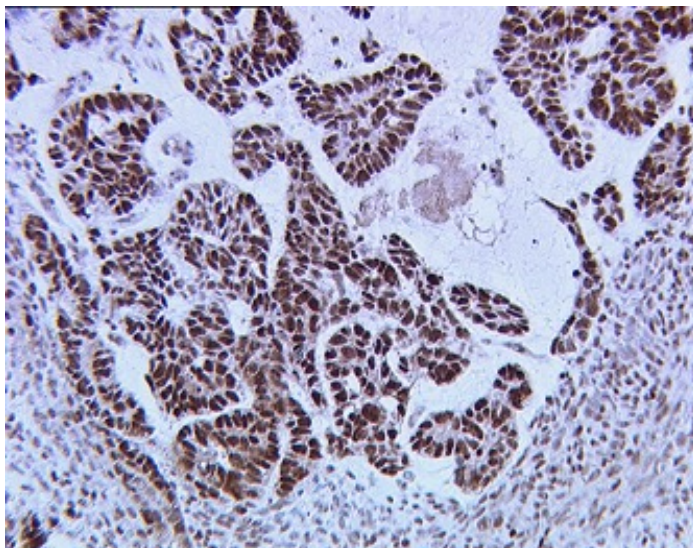


Abbildung 25: BAAT1, 100-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv ohne Mutation, IRS nukleär = 12, IRS zytoplasmatisch = 6

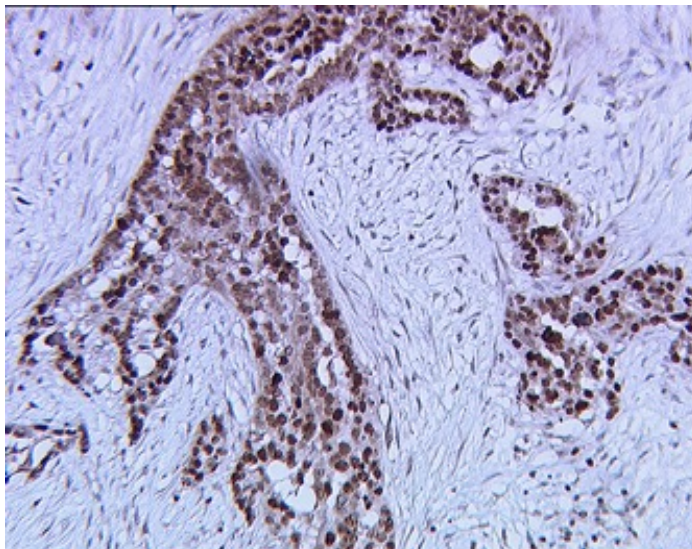


Abbildung 26: BAAT1, 100-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv mit Mutation, IRS nukleär = 12, IRS zytoplasmatisch = 6

### 5.1.3 Immunhistochemische Färbung BAP 1

In 32 von 40 Fällen (80 Prozent) zeigt sich eine positive zytoplasmatische Expression. Lediglich acht Fälle (davon fünf mit Mutation (25%), drei Fälle ohne Mutation (15%)) weisen keine Expression auf. Eine nukleäre Expression von BAP1 lässt sich bei drei Fällen (mutiert) aus 40 (7,5 Prozent) nachweisen, alle anderen 37 Fälle ergeben keine Expression.

Sowohl eine zytoplasmatische als auch eine nukleäre Expression zeigen drei Fälle (15% der mutierten), sie gehören alle zum Kollektiv mit Mutation.

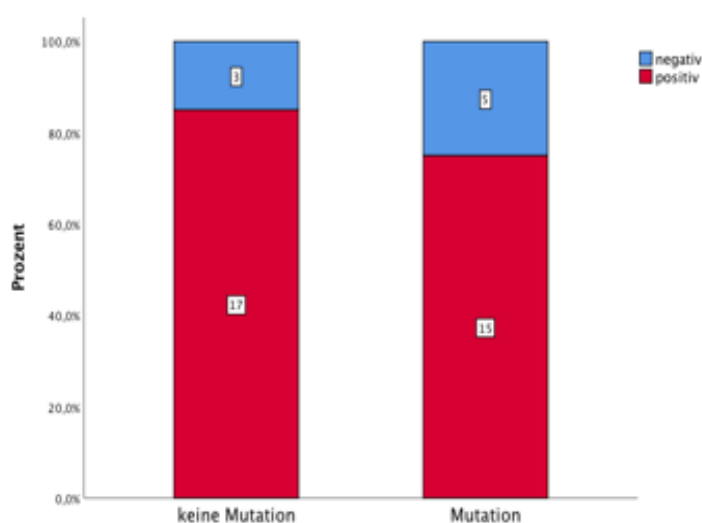


Abbildung 27: Verteilung der zytoplasmatischen BAP1-Expression

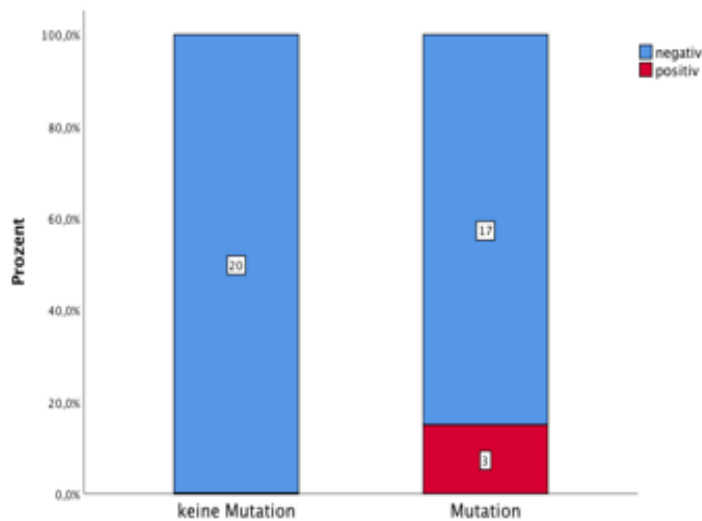


Abbildung 28: Verteilung der nukleären BAP1-Expression

Der Prozentsatz positiver Zellen verteilt sich wie folgt:

PpZ	1	2	3	4	Gesamt
<b>Keine Mutation</b>	1 (5%)	2 (10%)	17 (85%)	0 (0%)	20
<b>Mutation</b>	0 (0%)	6 (30%)	11 (55%)	3 (15%)	20
<b>Gesamt</b>	1 (2,5%)	8 (20%)	28 (70%)	3 (7,5%)	40

Tabelle 22: PpZ BAP1 zytoplasmatisch

PpZ	0	1	2	3	Gesamt
<b>Keine Mutation</b>	18 (90%)	1 (5%)	1 (5%)	0 (0%)	20
<b>Mutation</b>	10 (50%)	5 (25%)	2 (10%)	3 (15%)	20
<b>Gesamt</b>	28 (70%)	6 (15%)	3 (7,5%)	3 (7,5%)	40

Tabelle 23: PpZ BAP1 nukleär

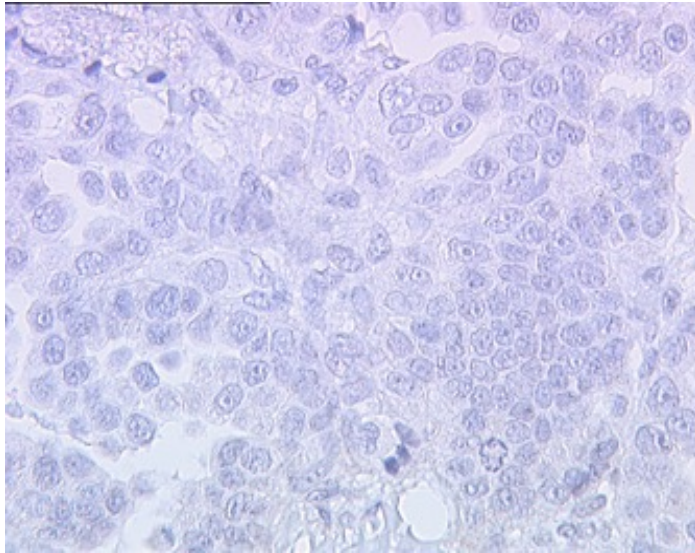


Abbildung 29: BAP1, 250-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv mit Mutation, IRS zytoplasmatisch = 2, IRS nukleär = 0

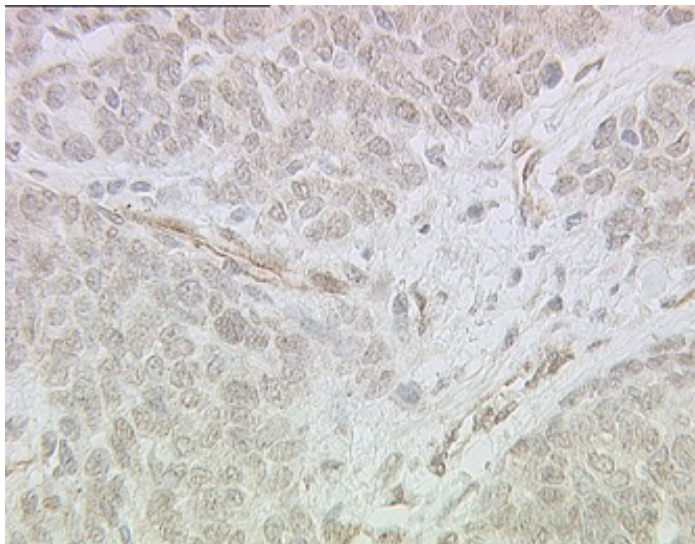


Abbildung 30: BAP1, 250-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv mit Mutation, IRS nukleär = 3, IRS zytoplasmatisch = 6



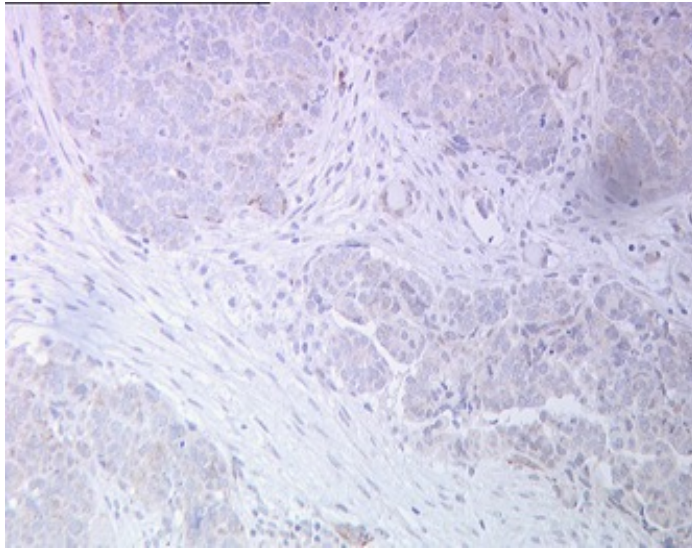


Abbildung 31: BAP1, 100-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv mit Mutation, IRS nukleär = 0, IRS zytoplasmatisch = 4

#### 5.1.4 Immunhistochemische Färbung FANCI

Eine positive zytoplasmatische Expression zeigt sich in 31 von 40 Fällen (77,5%), die neun negativen Fälle (22,5%) setzen sich aus vier Fällen der mutierten Gruppe (20% der mutierten) und fünf Fällen der nicht mutierten Gruppe (25% der nicht mutierten) zusammen.

Eine nukleäre Expression findet sich in 19 von 40 Fällen (47,5%) 21 von 40 Fällen sind negativ (52,5%). Die positive Expression teilt sich in 10 Fälle der mutierten Gruppe (50%) sowie 9 der nicht mutierten Gruppe (45%). Entsprechend 10 Fälle der mutierten Gruppe (50%) und 11 Fälle der nicht mutierten Gruppe (55%) zeigen keine nukleäre Expression.

Sowohl eine zytoplasmatische als auch eine nukleäre Expression lässt sich in 17 von 40 Fällen (42,5%) nachweisen. Dabei gehören 9 Fälle zum mutierten Kollektiv (45%), 8 Fälle (40%) zum nicht mutierten Kollektiv.

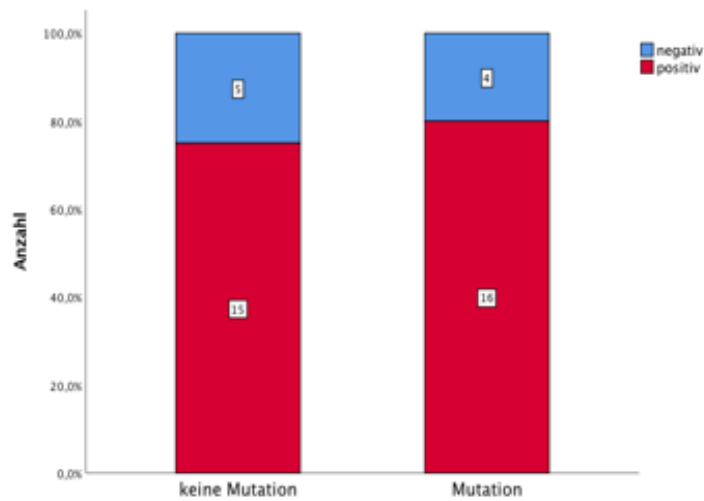


Abbildung 32: Verteilung zytoplasmatische FANCI-Expression

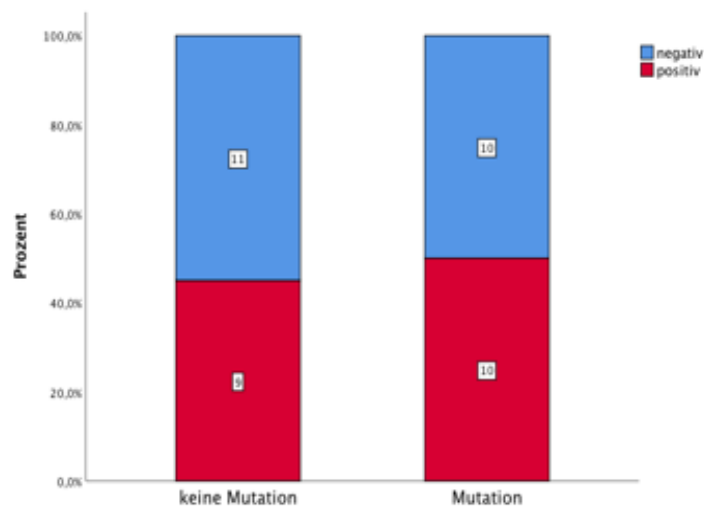


Abbildung 33: Verteilung nukleäre FANCI-Expression

PpZ	0	1	2	3	4	Gesamt
<b>Mutation</b>	0 (0%)	0 (0%)	4 (20%)	10 (50%)	6 (30%)	20
<b>Keine Mutation</b>	0 (0%)	0 (0%)	7 (35%)	8 (40%)	5 (25%)	20
<b>Gesamt</b>	0 (%)	0 (0%)	11(27,5%)	18 (45%)	11(27,5%)	40

Tabelle 24: PpZ FANCI zytoplasmatisch

PpZ	0	1	2	3	4	gesamt
<b>Mutation</b>	0 (0%)	5 (25%)	9 (25%)	4 (20%)	2 (10%)	20
<b>Keine Mutation</b>	4 (20%)	4 (20%)	4 (20%)	5 (25%)	3 (15%)	20
<b>Gesamt</b>	4 (10%)	9 (22,5%)	13 (32,5%)	9 (22,5%)	5(12,5%)	40

Tabelle 25: PpZ FANCI nukleär

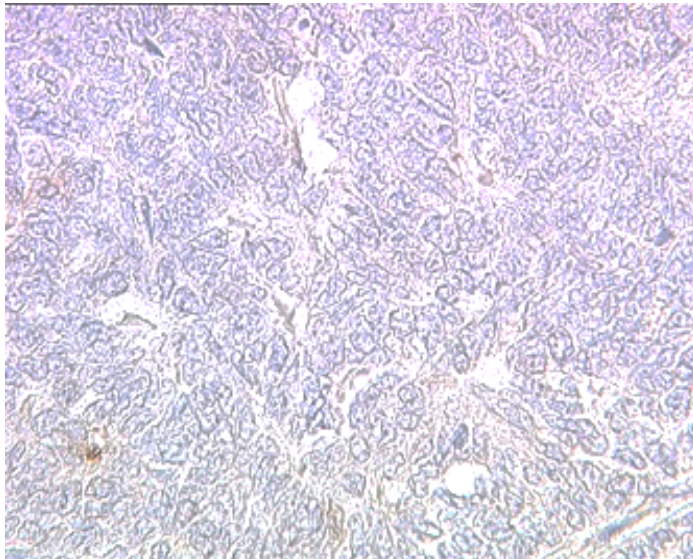


Abbildung 34: FANCI, 250-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv ohne Mutation, keine nukleäre Expression (IRS = 0)

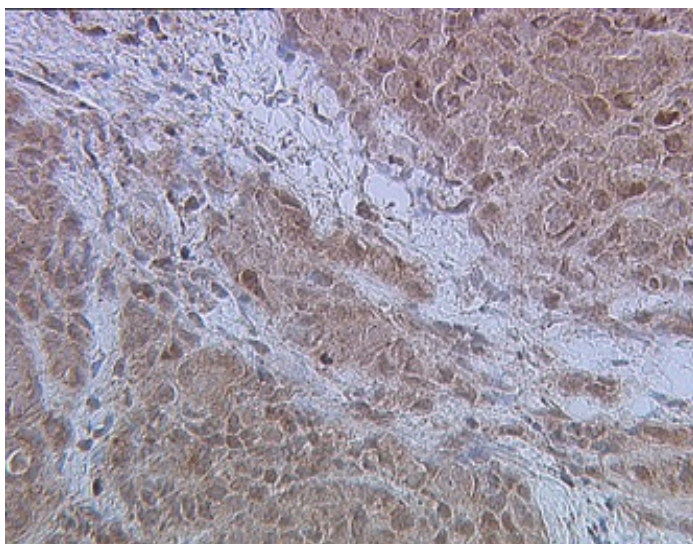


Abbildung 35: FANCI, 250-fache Vergrößerung, Beispiel aus der Gruppe mit Mutation, IRS nukleär = 1, IRS zytoplasmatisch = 8



### 5.1.5 Immunhistochemische Färbung CtIp

Eine positive nukleäre Expression findet sich in 20 Fällen (50%). Von diesen zwanzig Fällen sind elf Fälle (55%) aus der mutierten und neun Fälle (45%) aus der nicht mutierten Gruppe. Von 40 Fällen zeigt sich eine positive nukleäre Expression in 20 Fällen (50 Prozent). Eine nukleäre Negativität besteht bei zwanzig Fällen (50%), wobei hiervon elf Fälle (55%) keine Mutation zeigen und neun Fälle (45%) eine Mutation haben.

Alle vierzig Fälle (100%) zeigen im Zytoplasma eine Expression. Zur genauen Verteilung siehe Abbildung 37 und 38:

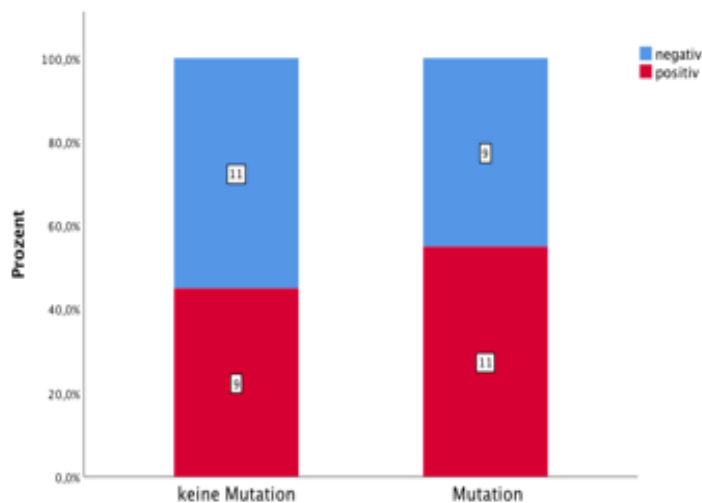


Abbildung 36: Verteilung nukleäre CtIp-Expression

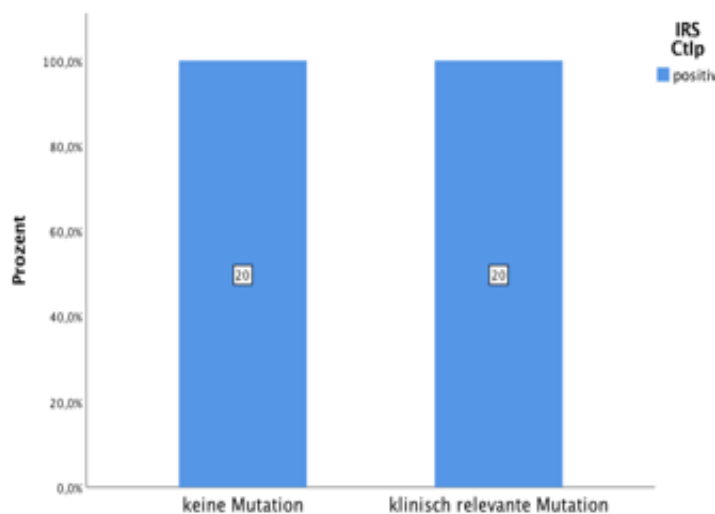


Abbildung 37: Verteilung cytoplasmatische CtIp-Expression

PpZ	3	4
<b>Keine Mutation</b>	20 (62,5%)	0 (0%)
<b>Mutation</b>	12 (37,5%)	8 (100%)
<b>Gesamt</b>	32	8

Tabelle 26: PpZ CtIp zytoplasmatisch

PpZ	0	1	2	3	4	Gesamt
<b>Keine Mutation</b>	2 (10%)	6 (30%)	7 (35%)	5 (25%)	0 (0%)	20
<b>Mutation</b>	0 (0%)	8 (40%)	4 (20%)	6 (30%)	2 (10%)	20
<b>Gesamt</b>	2 (5%)	14 (35%)	11 (27,5)	11 (27,5%)	2 (5%)	40

Tabelle 27: PpZ CtIp nukleär

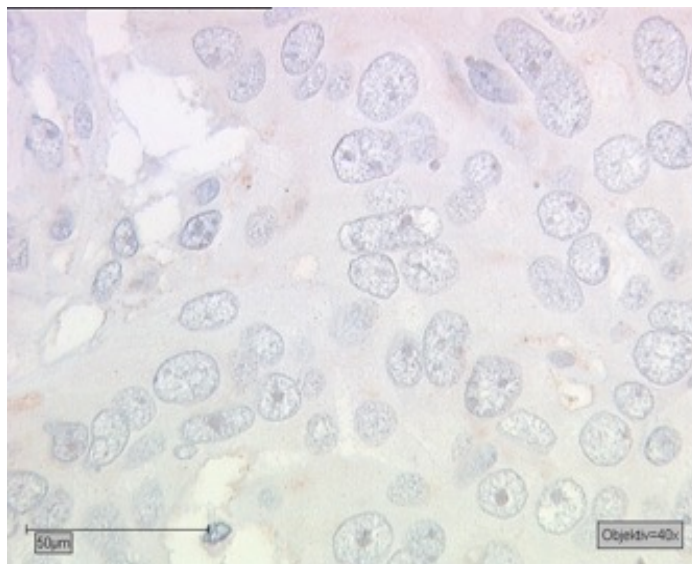


Abbildung 38: CtIp, 400-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv mit Mutation, IRS nukleär = 1

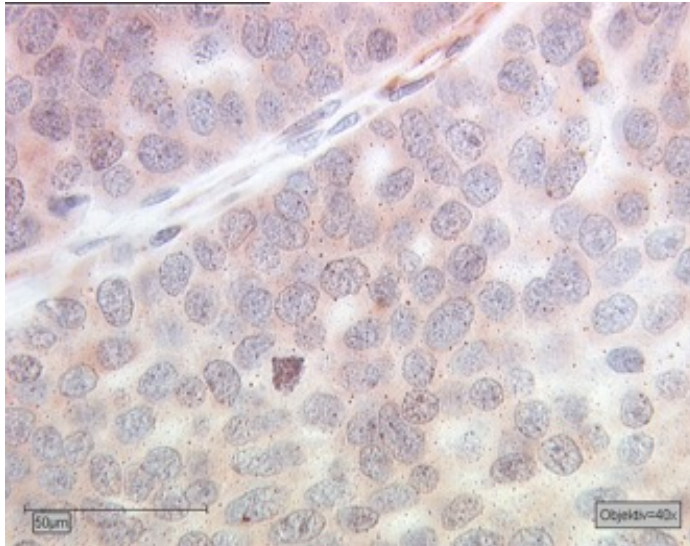


Abbildung 39: CtIp, 400-fache Vergrößerung, Beispiel aus dem Kollektiv ohne Mutation, IRS nukleär = 4

## 5.2 Korrelation von HSPC142, BAP1, FANCI, BAAT1 und CtIp

Für die Korrelation zwischen den einzelnen Färbungen wurde der PpZ sowie der IRS jeweils zytoplasmatisch und nukleär betrachtet. Um Zusammenhänge aufzuzeigen, wurde durch Boxplots jeweils ein Median pro Färbung für die zwei Gruppen Mutation/keine Mutation erstellt. Im Folgenden beispielhaft eine Übersichtstabelle über alle fünf Färbungen bezogen auf den IRS im Kern sowie im Zytoplasma (Tabelle 29).

	IRS Cytoplasma		IRS Cytoplasma codiert		IRS Kern		IRS Kern codiert	
Färbung	Keine Mutation	Mutation	Keine Mutation	Mutation	Keine Mutation	Mutation	Keine Mutation	Mutation
HSPC142	7,0	5,00	3,00	2,5	-	-	-	-
BAP1	4,5	6,00	2,5	3,00	0	0,5	1,00	1,00
FANCI	3,00	3,00	2,00	2,00	2,00	3,00	1,00	1,00
BAAT1	6,00	6,00	3,00	3,00	8,00	8,00	3,00	3,00
CtIp	6,00	6,00	3,00	3,00	2,00	4,00	1,00	2,00

Tabelle 28: Übersicht über die Mediane pro Färbereaktion

Die Analyse der Boxplots sowie die anhand der Ergebnisse der Tabelle durchgeführten Kreuztabellen zeigten eine signifikante positive Korrelation zwischen dem zytoplasmatischen PpZ BAAT1 und dem PPZ der BAP1 Färbung bezogen auf die Fälle mit Mutation ( $p = 0,014$ ,  $n = 20$ ).

PpZ BAAT1 Zyt					
2		3	4	Gesamt	
PpZ BAP1	2	1	5	0	6
	3	0	8	3	11
	4	0	0	3	3
Gesamt	1	13	6	20	

Tabelle 29: Korrelation des Prozentsatzes positiver Zellen im Zytoplasma von BAAT1 und BAP1, Exakter Test nach Fisher (Exakte Signifikanz 2-seitig), p-Wert = 0,014

Eine ebenso signifikante positive Korrelation zeigt sich auch zwischen dem zytoplasmatischen PpZ der BAAT1 und FANCI-Expression (p-Wert = 0,046, n = 20)

PpZ BAAT1 Zyt					
2		3	4	Gesamt	
PpZ FANCI	2	1	3	0	4
	3	0	8	2	10
	4	0	2	4	6
Gesamt	1	13	6	20	

Tabelle 30: Korrelation des Prozentsatzes positiver Zellen im Zytoplasma BAAT1 und FANCI, Exakter Test nach Fisher (Exakte Signifikanz 2-seitig), p-Wert = 0,046

Zuletzt besteht eine signifikante positive Korrelation bezüglich des IRS zwischen HSPC (zytoplasmatisch) und FANCI (nukleär) (p = 0,017, n = 20).

IRS HSPC Zyt						
2		3	4	6	8	Gesamt
IRS Kern FANCI 1	0	4	0	1	0	5
2	2	2	0	1	0	5

4	0	0	1	4	0	5
6	0	0	1	2	0	3
8	0	0	0	1	0	1
9	0	0	0	0	1	1
<b>Gesamt</b>	2	6	2	9	1	20

Tabelle 31: Korrelation zwischen IRS FANCI nukleär und IRS HSPC142 zytoplasmatisch, Exakter Test nach Fisher (exakte Signifikanz 2-seitig), p-Wert = 0,017

### 5.3 Immunhistochemische Färbung CtIP am OVCA- TMA Panel

Von 299 Fällen konnten 258 ausgewertet werden. Von diesen 258 Fällen zeigen vier (1,6 %) keine zytoplasmatische Expression und 254 (98,4%) eine positive Expression im Zytoplasma.

Eine positive nukleäre Expression findet sich bei 129 von 258 Fällen (50%), 129 Fälle (50%) exprimieren nicht im Kern.

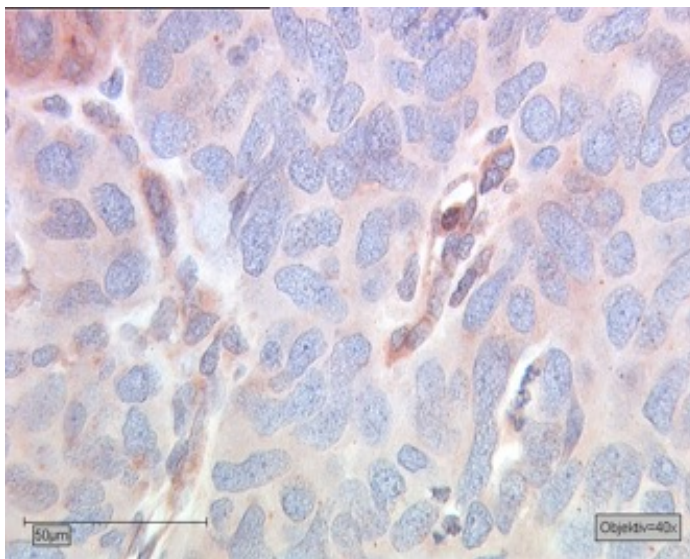


Abbildung 40: CtIp, 400-fache Vergrößerung, high- grade seröses Ovarialkarzinom, IRS zytoplasmatisch = 6, keine nukleäre Expression

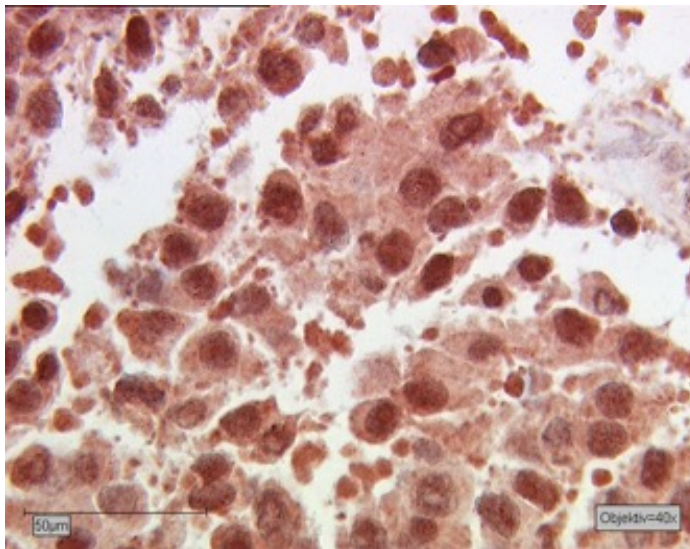


Abbildung 41: CtIp, 400-fache Vergrößerung, high-grade seröses Ovarialkarzinom, IRS nukleär = 12

### 5.3.1 CtIp Expression in Abhängigkeit von der Histologie

Es zeigt sich eine statistisch signifikante Expressionsverteilung von CtIp im Cytoplasma (IRS) bezüglich der verschiedenen histologischen Klassifikationen (Tabelle 32).

Histologie	IRS 0	2	3	4	6	8	9	12	Gesamt
serös G1	0	0	1	2	1	8	0	3	15
serös G3	2	1	12	42	20	98	4	22	201
endometrioid	0	1	4	1	3	2	0	7	18
muzinös	0	0	0	3	1	4	0	2	10
klarzellig	0	0	3	0	0	1	0	0	4
undifferenziert	0	0	0	2	1	5	0	0	8
seromuzinös	0	0	1	0	1	0	0	0	2
<b>Gesamt</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>21</b>	<b>50</b>	<b>27</b>	<b>118</b>	<b>4</b>	<b>34</b>	<b>258</b>

Tabelle 32: IRS Werte der CtIp Färbung im Zytoplasma in Abhängigkeit von der Histologie, Exakter Test nach Fisher mit  $p = 0,01$ .

Betrachtet man die Gruppe der serösen Karzinome allein unter Bezugnahme der Graduierung ( $p = 0,087$ ) zeigt sich keine Signifikanz.

### 5.3.2 Proteinexpression in Abhängigkeit vom Grading

Es ergaben sich keine Signifikanzen zwischen der zytoplasmatischen oder nukleären CtIp-Expression oder des IRS und dem Grading.

## 5.4 Kaplan-Meier-Überlebenskurven

258 Patienten (86,3%) des TMA-Kollektivs werden für die Berechnung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven eingeschlossen, 41 Fälle (13,7%), die nicht ausgewertet werden konnten, werden ausgeschlossen.

Der Remmele- Score wird aus Übersichtsgründen in ein vierstufiges Scoringssystem modifiziert. Hierbei entspricht Stufe 0 einem IR-Score von 0-2, Stufe 1 einem IR-Score von 3-4, Stufe 2 einem IR-Score von 6-8 und Stufe 3 einem IR-Score von 9-12.

### 5.4.1 Faktor FIGO-Stadium und Grading in der Überlebensfunktion

Das Gesamtüberleben korreliert signifikant mit dem FIGO Stadium ( $p\text{-Wert} < 0,01$ ).

Patienten mit FIGO Stadium IV zeigen ein deutlich schlechteres Gesamtüberleben als Patienten in FIGO Stadium I (Abbildung 43).

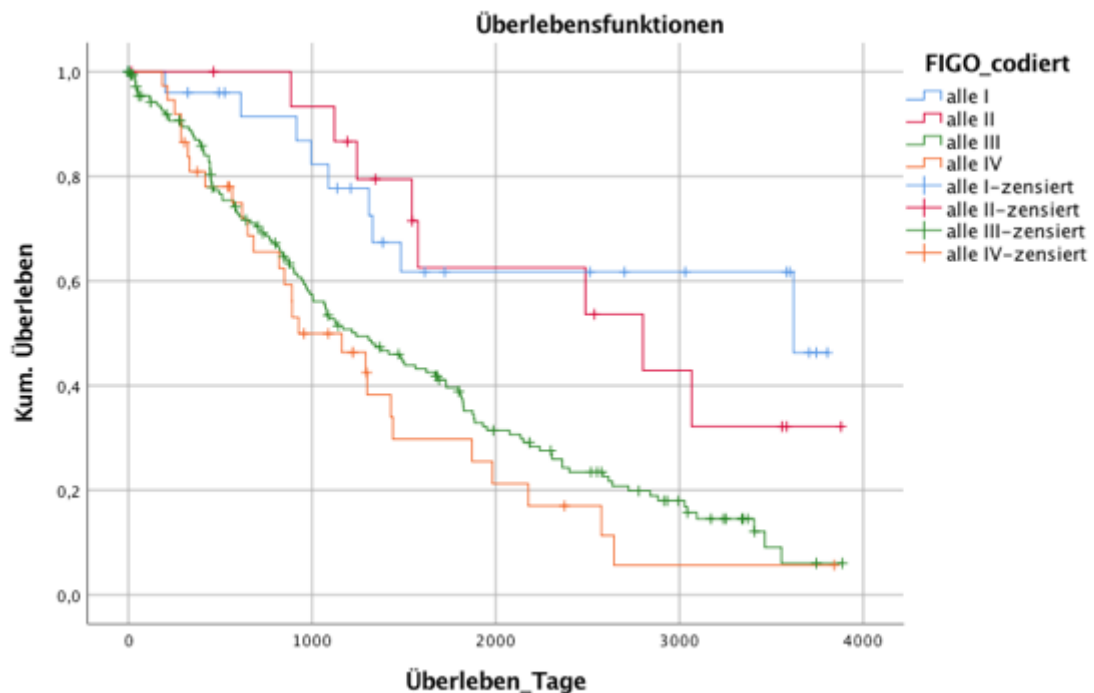


Abbildung 42: Überlebensfunktion in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium, Log Rank Test: Chi-Quadrat = 20,155, p-Wert < 0,01

Auch das Grading korreliert signifikant mit dem Überleben ( $p = 0,003$ ) (Abbildung 44).

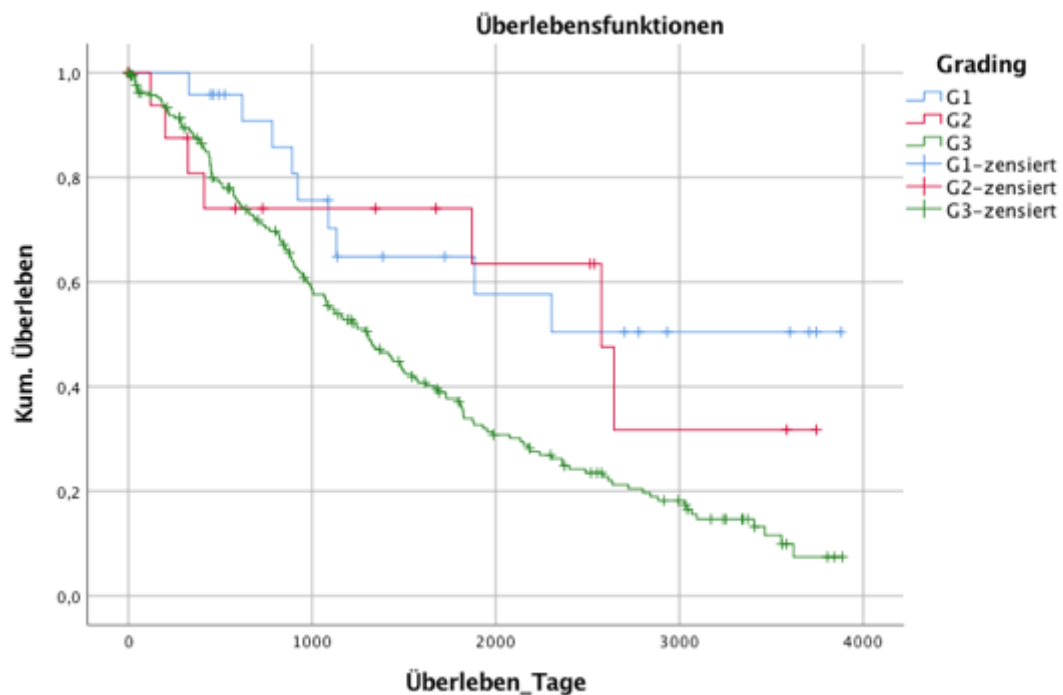


Abbildung 43: Überlebensfunktion in Abhängigkeit vom Grading, Log Rank Test: Chi-Quadrat = 11,31, p-Wert = 0,003.

#### 5.4.2 Zytoplasmatische CtIp-Expression in der Überlebensfunktion

Die CtIp-Expression im Zytoplasma bzw. der Remmele Score weist bezogen auf alle Fälle ( $n = 258$ ) einen Trend ( $p = 0,073$ ) auf (Abbildung 45).

Wird nur die Gruppe der serösen Ovarialkarzinome betrachtet, korreliert die CtIp-Expression nicht mit dem Gesamtüberleben ( $p = 0,22$ ).

Analysen zur Abhängigkeit des Überlebens vom PpZ der CtIp-Expression zeigen keine Signifikanzen, im Log-Rank Test ergibt sich für alle 258 Fälle ein p-Wert von 0,5 (Abbildung 46).



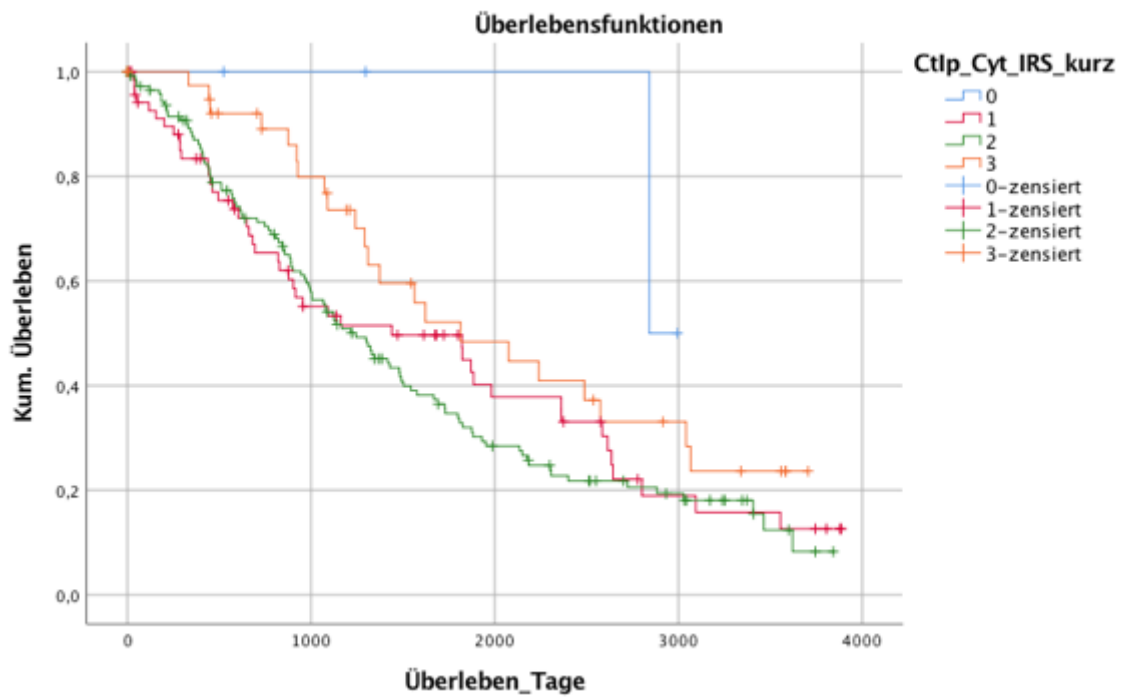


Abbildung 44: Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der CtIp-Expression (IRS) im Zytoplasma, Log-Rank: Chi-Quadrat = 6,973, p-Wert = 0,073

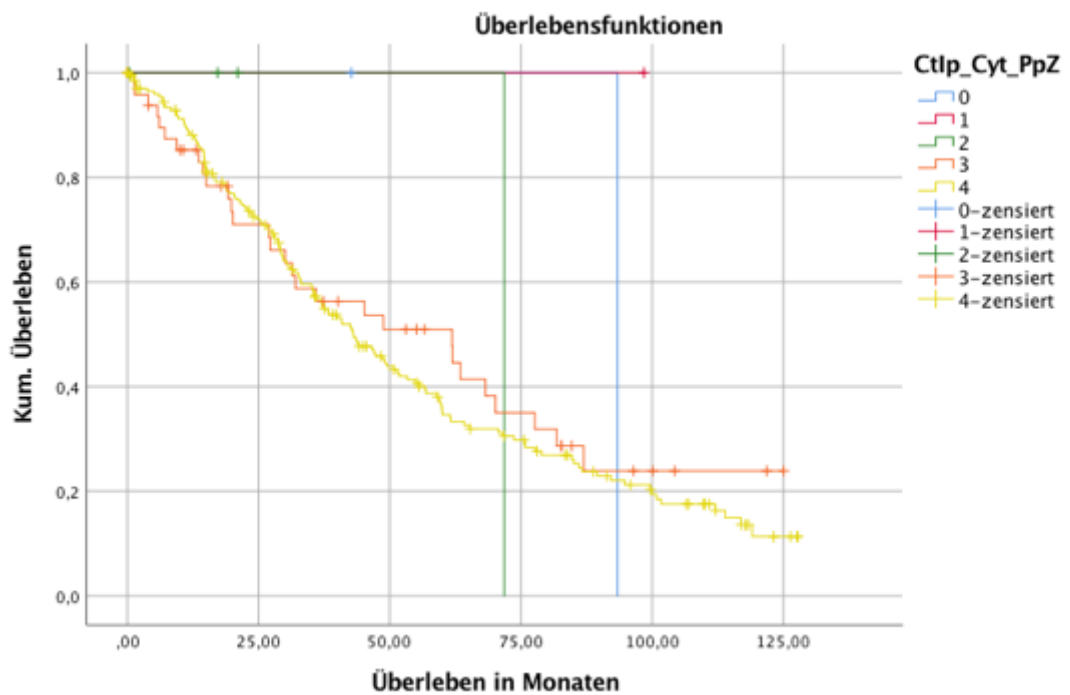


Abbildung 45: Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der CtIp-Expression (PpZ) im Zytoplasma, Log Rank: Chi-Quadrat = 2,905 und p-Wert = 0,57

### 5.4.3 Nukleäre CtIp- Expression in der Überlebensfunktion

Die Untersuchung auf Unterschiede im Gesamtüberleben hinsichtlich der nukleären CtIp-Expression bzw der Höhe des Remmele-Scores zeigt für alle 258 Fälle im Log-Rank-Test einen p-Wert von 0,17 (Abbildung 47).

Betrachtet man nur die serösen OVCA ergibt sich ein p-Wert von 0,34 und somit keine statistische Signifikanz.

Analysen zur Abhängigkeit des Überlebens vom PpZ der nukleären CtIp-Expression zeigen keine Signifikanzen, im Log-Rank Test ergibt sich für alle 258 Fälle ein p-Wert von 0,49 (Abbildung 48).

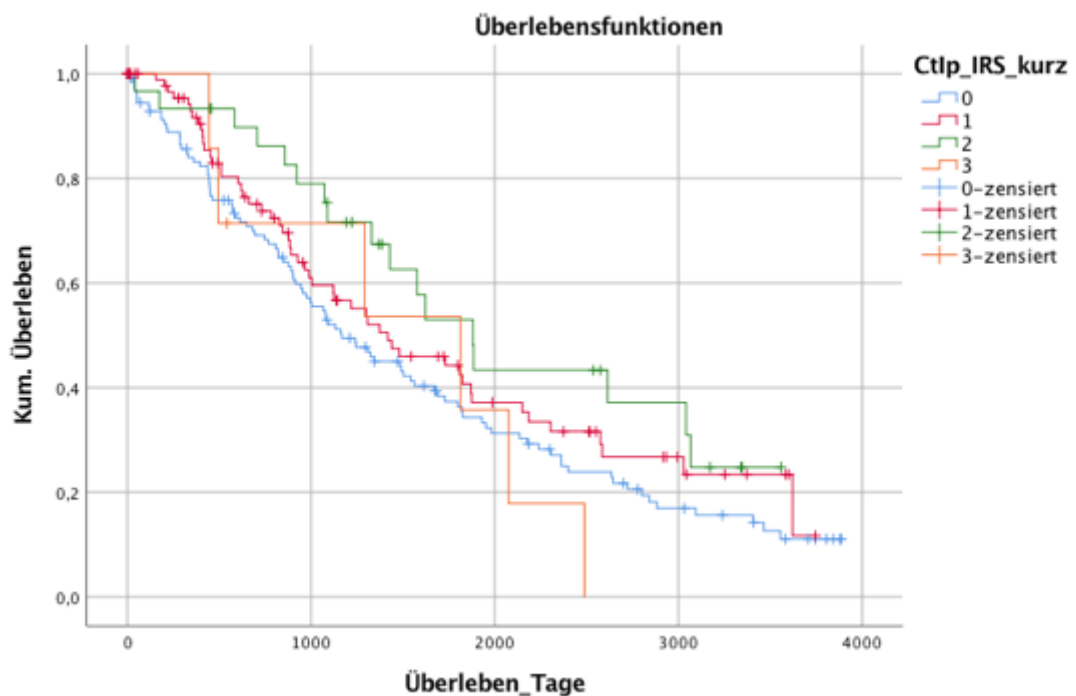


Abbildung 46: Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der CtIp-Expression (IRS) nukleär, Log Rank: Chi-Quadrat = 5,027 und einem p-Wert = 0,17

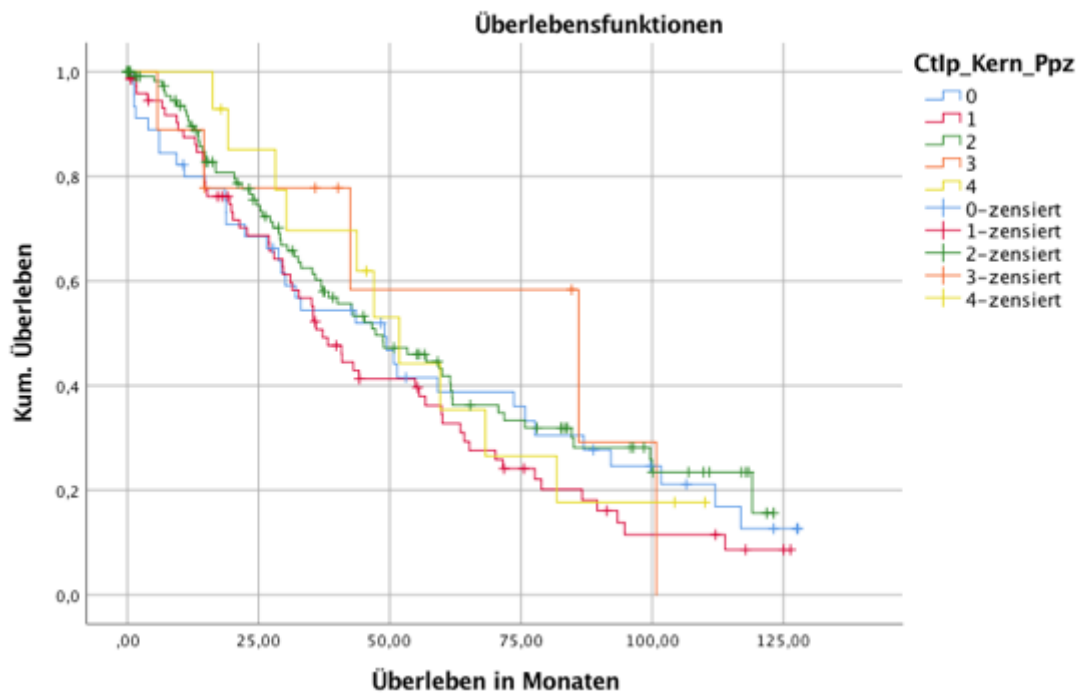


Abbildung 47: Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der CtIp-Expression (PpZ) nukleär, Log-Rank: Chi-Quadrat = 3,406, p-Wert = 0,49

Auch innerhalb der großen Gruppe von Tumoren mit FIGO III-stadium ergibt sich keine Signifikanz zwischen der CtIp-Expression (nukleär oder zytoplasmatisch), sodass auf eine weiterführende Cox-Regression verzichtet wird.

## 6 Diskussion

### 6.1 Einführung

Das Ovarialkarzinom ist ein geschlechtsspezifisches Malignom der Frau, welches mit spät auftretenden und unspezifischen Symptomen assoziiert ist. Bisher existiert keine etablierte Screeningmethode. Aus diesen Gründen werden Ovarialkarzinome oft in einem späten Stadium entdeckt und gehen dementsprechend mit einer schlechten Prognose einher (Kuhn und Keyver-Paik 2019). Den überwiegenden Anteil der Ovarialkarzinome bildet die Gruppe der serösen Karzinome, der sich wiederum unterteilt in eine große Gruppe von high grade serösen Karzinomen (>80 Prozent) und eine deutlich kleinere Gruppe von low-grade serösen Karzinomen (<20 Prozent). In diese Gruppe der high-grade serösen Karzinome fallen auch die meisten der familiären Ovarialkarzinome mit Nachweis einer BRCA1/2-Mutation (15-20%).

Der Goldstandard zum Nachweis einer BRCA-Mutation ist die NGS-Analyse. Die BRCA1 und BRCA2-Tumorsuppressorgene sind über komplexe Interaktionen mit den

fünf hier verwendeten Markern an der DNA Reparatur und somit an der Tumorentstehung vor allem bei Ovarialkarzinomen beteiligt. Zentrale Frage dieser Arbeit war, ob es möglich ist mit ausgewählten Antikörpern jene Fälle mit BRCA 1/2-Mutation immunhistochemisch zu detektieren. Dies könnte über die Unterschiede in der Proteinexpression zwischen mutierten und nicht mutierten Fällen geschehen. Prinzipiell wäre denkbar, dass einzelne Proteine bei einer Mutation in den BRCA-Genen reaktiv überexprimieren, andererseits wäre auch ein vollständiger Expressionsverlust möglich. Wünschenswert wäre es, in naher Zukunft ein immunhistochemisches Panel zu etablieren, das anhand dieser Expressionsunterschiede in BRCA-positiven und BRCA-negativen OVCAs verlässlich Auskunft über den Mutationsstatus geben kann. Diese immunhistochemische Vorselektion möglicher BRCA-positiver Fälle wäre eine deutlich schnellere und kostengünstigere Alternative zur kompletten Mutationsanalyse, auch um die Patientinnen schnellstmöglich einer Therapie zuzuführen. Ein weiterer Vorteil wäre auch die ubiquitäre Verfügbarkeit der Immunhistochemie.

## **6.2 Diskussion des Materials**

In dieser Arbeit lagen in dem für die Immunhistochemie verwendeten Kollektiv high-grade seröse OVCA- Fälle vor. Die Patientinnen wurden mit Cisplatin vorbehandelt und erhielten eine BRCA-Mutationsanalyse.

Kritikpunkte am untersuchten HGSOVCA-Patientenkollektiv der hier vorliegenden Arbeit sind sicherlich die geringen Fallzahlen ( $N = 40$ ), welche sich allerdings damit begründen lassen, dass BRCA- Mutationsanalysen zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeit, ausschließlich bei Fällen von primär operierten und mit Cisplatin vorbehandelten Patientinnen durchgeführt wurden. Wünschenswert wären neben einer größeren Fallzahl und dem Wissen um den BRCA-Mutationsstatus vollständig vorliegende klinische Daten, sodass ein Follow up mit Überlebenszeitanalysen durchgeführt werden könnte. Das Tumorregister München konnte nur vereinzelt klinische Daten zu den Fällen im Raum München beisteuern. Auf die restlichen, deutschlandweit verteilten Fälle fehlte der Zugriff. Einheitlich Informationen gab es folglich nur zur Histologie, zum FIGO-Stadium und zum Grading.

Im Gegensatz dazu lagen beim verwendeten TMA Panel lagen alle klinisch relevanten Parameter vor, allerdings gab es nur bei drei von 299 Patientinnen Informationen zum BRCA-Mutationsstatus. Es handelte sich hierbei jeweils um seröse G3 Karzinome, wovon zwei Fälle BRCA-negativ getestet wurden und ein Fall BRCA-positiv war. Aufgrund dieser geringen Datenlage zum BRCA-Mutationsstatus, lässt sich die

Vermutung, dass G3 seröse Karzinome mit zytoplasmatischer Überexpression von CtIp BRCA positiv sind, in dem hier vorliegenden Kollektiv weder bestätigen noch entkräften. Eine Prüfung dieser Hypothese müsste folglich an einem größeren Kollektiv mit bekanntem BRCA-Mutationsstatus erfolgen.

### **6.3 Immunhistochemie**

#### **6.3.1 HSPC**

Bei der HSPC Expression zeigte sich ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit vom Mutationsstatus. Die Gruppe der BRCA- positiven Fälle wies in 19 von 20 Fällen eine mittlere Proteinexpression im Zytoplasma auf (IRS 2-6). Nur ein Fall hatte eine starke Expression (IRS 8) Dagegen zeigte sich bei der Gruppe der BRCA-negativen Fällen eine gleichwertige mittlere und starke Proteinexpression. Diese Ergebnisse weisen auf den möglichen Trend hin, dass es bei BRCA-positiven Fällen eher zu einem Verlust der Expression des HSPC142 Proteins im Zytoplasma kommt. Diese Erkenntnis lässt sich kaum hinreichend mit Daten aus der Literatur vergleichen, da nur zwei Studien vorliegen, die zum Expressionsverhalten des HSPC142-Proteins Stellung nehmen. Symonowicz et al. untersuchten die Rolle der Proteinkinase B (Akt) in der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika sowie damit einhergehender schlechterer Prognose in spezifischen Tumortypen. DNA-PKCs (katalytische Untereinheit der Proteinkinase) phosphorylieren Akt an einem spezifischen Serinrest. Es sollte untersucht werden, ob sie auch durch Strahlung herbeigeführte Akt-S473 Phosphorylierung in noch intakten Krebszellen modulieren. Dafür wurde eine Analyse über den zeitlichen Zusammenhang der Phosphorylierung von Akt-S473 in bestrahlten DNA-PKC kompetenten und inkompetenten Glioblastomzellen durchgeführt. Ob eine genetische Inhibition von Akt assoziiert ist mit einer Dephosphorylierung von target proteins, welche an der HR beteiligt sind, wurde mit MERIT40 untersucht. Hierbei zeigte sich, dass inkompetente Akt1 zu einer Dephosphorylierung von MERIT führen. Diese Erkenntnis führte dazu zu prüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression von MERIT40/HSPC142 und dem Überleben von Krebspatienten gibt. Es zeigte sich, dass eine hohe Expression von MERIT mit einem schlechteren Überleben bei Patienten mit Ovarialkarzinom einhergeht (Szymonowicz et al. 2018; Györfy et al. 2012).

Diese Studie hat thematisch einen anderen Forschungsschwerpunkt. Erst im Verlauf wurde die Rolle von Proteinen interessant, welche an der DNA-Reparatur beteiligt sind und MERIT40 in den Fokus genommen. Insofern sind die Erkenntnisse zum Expressionsverhalten von MERIT40 nur bedingt übertragbar auf diese Arbeit. Unklar

bleibt zudem, ob es sich bei den überwiegend serösen Karzinomen um eine zytoplasmatische oder nukleäre Überexpression des Proteins handelt, der BRCA-Mutationsstatus wird nicht erwähnt.

Die Arbeitsgruppe um Bolton et al. untersuchten in einer Studie aus dem Jahr 2010 das Überleben von Patientinnen mit EOC (epithelial ovarian cancer) und fand dabei eine Assoziation von zwei SNP mit dem Überleben in epithelialen Ovarialkarzinomen. Die Analyse von möglichen „susceptibility genes“ zeigte, dass MERIT40 bestehend aus dem SNP rs8170 eine tragende Rolle in der Entwicklung von EOC zeigt. Bolton et.al postulierte, dass eine Überexpression von MERIT40 das mutierte BRCA1-Protein innerhalb des Komplexes stabilisieren könnte. Gleichzeitig könnte die Überexpression von MERIT40 auch als reaktive Aktion gedeutet werden, um einen protektiven Effekt auf BRCA-mutierte Zellen auszuüben, sodass diese vermehrt Toleranz gegenüber DNA Strangbrüchen entwickeln (Bolton et al. 2010; Villanueva 2010). Kritikpunkt dieser Studie ist, dass nicht ersichtlich ist, ob die Überexpression zytoplasmatisch oder nukleär aufgetreten ist.

Eine reaktive Überexpression des HSPC142 Proteins bei BRCA-Mutation konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

### **6.3.2 CtIp**

CtIp zeigt eine Proteinexpression sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern jeweils für mutierte und nicht mutierte Fälle. Acht Fälle der BRCA-positiven Gruppe zeigen einen PpZ von über 80 Prozent, dagegen wurden alle BRCA- negativen Fälle mit einem PpZ von 3 (51-80% positive Zellen) bewertet. Auch bezüglich des IRS gibt es in der BRCA-positiven Gruppe fünf Fälle, die mit einem IRS von 8-12 beurteilt wurden. Das wirft die Vermutung auf, dass BRCA-mutierte Fälle zu einer zytoplasmatischen CtIP Überexpression neigen.

Laut Zhang et. al scheint das CtIp- Gen in unterschiedlicher Weise bei der Entstehung von einigen Karzinomtypen eine essentielle Rolle einzunehmen: Assoziiert mit einer CtIp Deletion/LOH of RBBP8 und damit einhergehender schlechter Prognose ist neben dem invasiven Harnblasenkarzinom das Ovarialkarzinom. In einigen anderen Karzinomtypen wird von einer Überexpression von CtIp gesprochen, beim Mammakarzinom scheint eine geringe Expression des CtIp mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet zu sein (Mijnes et al. 2018; Quaye et al. 2009; Xu et al. 2007; Zhang et al.).

Bretones et al. untersuchte 384 Fälle von Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom auf die Expression von CtIp und dessen Korrelation mit dem Überleben. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine fehlende nukleäre CtIp-Expression in invasiven, fortgeschrittenen Mammakarzinomen gefunden wurde, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit über das T1- Stadium hinausgehen (Soria-Bretones et al. 2013). Auch die Untersuchungen von Wang et al. zeigen ähnliche Ergebnisse. Hier wurde die CtIp Expression und dessen Einfluss auf das Gesamtüberleben untersucht. Verglichen wurden hierbei zwei große, veröffentlichte Datasets (GSE10780 und GSE744), welche Gewebeproben von normalem Brustgewebe und Tumorgewebe enthielten. Es stellte sich heraus, dass die CtIp-Expression in Mammakarzinomen im Vergleich zu gesunden Gewebe weniger stark ist und eine geringe Expression mit geringeren Überlebensraten assoziiert ist. Dies zeigt sich am eindrucklichsten bei Östrogen- negativen Mammakarzinomen (Wang et al. 2016). Gleichzeitig verweisen Bretones et. al darauf, dass es basierend auf mRNA Studien in manchen Karzinomtypen zu einer Überexpression von CtIp kommen könnte. In der entsprechenden Studie wird die Vermutung allerdings nicht weiter gefestigt. Es wurde lediglich die Proteinkinase TRB3 untersucht, welche die Ubiquitinierung von Proteinen, die an der Zellzyklusregulierung beteiligt sind fördert, mit CTIp interagiert und ebenfalls nukleär lokalisiert ist. Eine hohe Expression zeigt TRB3 in verschiedenen Tumoren wie Lunge, Ösophagus und Colon. Da es mit CtIp interagiert, wird vermutet, dass auch dieses Protein als Tumorsuppressor Relevanz haben könnte und die beiden Proteine sich gegenseitig funktionell regulieren. Ob auch CtIp dementsprechend in gleichen Karzinomtypen überexprimiert wird, ist nicht dargestellt. Weitere Studien zur CtIp Expression speziell bei Ovarialkarzinomen liegen aktuell nicht vor.

Folglich darf die in der hier vorliegenden Arbeit demonstrierte zytoplasmatische CtIp Überexpression bei BRCA-positiven Ovarialkarzinomen als neue Erkenntnis gewertet werden.

Eine Erklärung für diese Überexpression von CtIp bei BRCA-positiven Ovarialkarzinomen könnte auf molekularer Ebene die folgende sein: CtIp bindet an BRCA1 in der G2 Phase und ist für die Aktivierung der Checkpoint-Kinase1 verantwortlich. Ohne die Bindung von BRCA an CtIp ist eine normale DNA „damage response“ nicht möglich. Die Vorstellung, dass CtIp vermehrt exprimiert wird, wenn die BRCA Funktion eingeschränkt oder aufgehoben ist, müsste weiter untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich die Überexpression nur zytoplasmatisch. Zwar findet

sich auch eine nukleäre Expression, diese ist jedoch gleich verteilt auf BRCA-positiven und BRCA-negativen Fälle.

Die Korrelation dieser beiden Proteinexpressionen, HSPC142 und CtIp erbrachte keine signifikanten Ergebnisse, so dass eventuell von unabhängigen Ereignissen ausgegangen werden muss. Da es zum aktuellen Zeitpunkt noch keine Studien dazu gibt, die aufzeigen inwiefern eine BRCA-Mutation die Proteinexpression von HSPC142 und CtIp beeinflusst, könnten diese Ergebnisse zumindest als erste Tendenz gewertet werden, dass offenbar Unterschiede in der Proteinexpression zwischen den Gruppen mutiert/nicht mutiert bestehen. Um diese Ergebnisse weiter zu festigen, sollten weitere Untersuchungen mit größeren Patientenkollektiven und zusätzlich anderen relevanten Proteinen, welche an der BRCA-Genese beteiligt sind, untersucht werden.

### **6.3.3 FANCI**

Eine FANCI-Expression ließ sich in den mutierten Fällen sowie den nicht mutierten Fällen jeweils zytoplasmatisch als auch nukleär nachweisen. Dabei ist das Verhältnis innerhalb der Gruppe mutiert/nicht mutiert recht gleich verteilt, allerdings exprimieren insgesamt 31 von 40 Fällen zytoplasmatisch, nukleär nur 21 von 40. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Expression mutierte Fälle/nicht mutierte Fälle.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit der Literatur, findet man nur eine Studie zur Expression von FANCI in Ovarialkarzinomen: Han et al untersuchte Proteinlevels von FANCI in Ovarialkarzinomen und gesunden Ovarien. Hierfür wurden dreißig Fälle von Ovarialkarzinompatientinnen in unterschiedlichen Stadien immunhistochemisch mit FANCI gefärbt und ausgewertet. Das Ergebnis erbrachte einen Unterschied des FANCI Protein-Levels in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium der Ovarialkarzinome. Seröse Ovarialkarzinome mit FIGO Level III gehen mit einer hohen FANCI Expression einher und sind assoziiert mit einem schlechteren Gesamtüberleben oder einer geringeren Rezidiv-freien Zeit (Han et al. 2019). Hieraus lässt sich ableiten, dass FANCI zelluläres Tumorstadium fördert und relevanten Einfluss auf die Tumorstadium hat. In dieser Arbeit ist nicht beschrieben, ob sich der immunhistochemische Score der jeweils für normales Ovargewebe, FIGO I und FIGO III erhoben wurde auf die nukleäre oder zytoplasmatische Expression bezieht.

Da in der vorliegenden Arbeit alle Fälle high- grade seröse OVCA sind, hätte hier ein Vergleich mit low grade /G1 oder normalem Gewebe erfolgen müssen, um die Daten mit denen von Han et al. vergleichen zu können. Aus der Studie von Han et al. ist nicht ersichtlich, ob es sich bei den untersuchten (serösen) OVCA um solche mit einer



möglichen BRCA-Mutation handelt. Aufgrund dieser ungleichen Studienverhältnisse lässt sich nur vermuten, dass G1 seröse Ovarialkarzinome, die ja typischerweise keine BRCA1/2-Mutation aufweisen, offenbar eine weniger stark ausgeprägte Expression von FANCI aufwiesen.

Des Weiteren könnte anlehnend an die initiale Idee von Han et al. untersucht werden, wie FANCI die Metastasenbildung in serösen OVCA abhängig vom BRCA-Status beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich bei Proteinexpression des FANCI Antikörpers im Zytoplasma eine Abhängigkeit vom Genort der BRCA-Mutation. Die Mutation kann auf dem BRCA1-Gen, dem BRCA2-Gen oder auf beiden lokalisiert sein. In der Gruppe der mutierten Fälle findet sich die höchste zytoplasmatische Expression mit sechs Fällen von über 80% auf BRCA2-Gen. Betrachtet man alle 40 Fälle zusammen, so exprimieren 18 Fälle im Zytoplasma mit einem PpZ von 51-80 %, acht Fälle die mit einer BRCA-Mutation auf Gen 2 einhergehen hingegen mit einem PpZ von über 80%.

Diese Ergebnisse sind insgesamt nicht signifikant ( $p = 0,052$ ). Sie könnten jedoch darauf hinweisen, dass die Proteinexpression von FANCI davon abhängig ist, ob eine BRCA1- oder BRCA2-Mutation oder eine Mutation auf beiden Genen vorliegt. Dies ist insofern interessant, da FANCI komplex mit BRCA1 und BRCA2 sowie anderen wichtigen Genen und deren Proteine an der DNA Reparatur beteiligt ist (Moes-Sosnowska et al. 2019). Da hierzu bislang keine Ergebnisse oder Studien vorliegen ist mit weiterführenden Studien zu untersuchen, inwiefern der Genort (Mutation auf BRCA 1 oder 2 Gen oder auf beiden) und seine veränderte Proteinexpression eine Relevanz hat für eine mögliche Subtypisierung der mutierten OVCAs, das Verständnis der komplexen Proteininteraktion bei DNA-Reparaturvorgängen und eventuell daraus entstehende klinische und therapeutische Konsequenzen.

Das Risiko bei Veränderungen im BRCA2-Gen bis zum 69. Lebensjahr an einem Ovarialkarzinom zu erkranken liegt bei ca. 11-22 % (Jaeger et al. 2018). Somit ist das Risiko bei Mutation im BRCA2-Gen zwar leicht erniedrigt im Vergleich zu BRCA1, aber nicht weniger relevant für das komplexe Verständnis der BRCA1/BRCA2-Gen Interaktion auf molekulargenetischer Ebene. Interessant ist, dass FANCI aktiv nur an BRCA1 und nicht BRCA2 bindet, die Expression im Zytoplasma bei BRCA2-Mutation in der Gruppe der mutierten Fälle aber stärker ist.

#### 6.3.4 BAP1

BAP1 ist ein überwiegend nukleär vorliegendes Protein, welches über die Ringfinger-Domäne an BRCA1 bindet. In der vorliegenden Arbeit zeigt BAP1 unabhängig vom Mutationsstatus eine überwiegend zytoplasmatische Expression. Eine nukleäre Expression findet sich nur in 3 von 40 Fällen, bei diesen 3 Fällen handelt es sich um BRCA mutierte Fälle. Innerhalb der Expressionsstärke zeigte sich weder nukleär noch zytoplasmatisch zwischen den Gruppen Mutation/keine Mutation ein signifikanter Unterschied. Vergleicht man diese Beobachtungen mit der Literatur, wird ersichtlich, dass aktuell wenig Kenntnis über eine BAP1 Expression in BRCA mutierten high- grade serösen OVCA vorliegt. Mc Gregor et al. untersuchte 2016 die BAP1 Expression anhand von 14 serösen Ovarialkarzinomen. Dabei hatten 13 Fälle eine Mutation im BRCA1- Gen und ein Fall eine Mutation in BRCA2-Gen. Zusätzlich waren fünf Fälle ohne BRCA-Mutation BAP1 positiv. Hierbei wurde gezeigt, dass in allen Fällen eine nukleäre Expression vorlag, unabhängig vom BRCA-Status. Variable zytoplasmatische Färbung konnte auch beobachtet werden. (McGregor et al. 2016). Entgegen anderer Behauptungen, dass es in Ovarialkarzinomen zu einem nukleären BAP1 Expressionsverlust kommen könnte, konnten somit nicht bestätigt werden. Andrici et al. beschäftigten sich in ihrer Arbeit mit der Frage ob BAP1 als immunhistochemischer Marker zur Unterscheidung zwischen gynäkologischen serösen Karzinomen bzw. primär peritoneal serösen Karzinomen von abdominellen Mesotheliomen einen Beitrag leisten könnte. Unter den gynäkologischen serösen Karzinomen waren 65% ovariellen Ursprungs. Auch diese Arbeitsgruppe kam zu dem Schluss, dass nicht generell von einem BAP1-Expressionsverlust in serösen OVCA gesprochen werden kann, da dieser nicht ubiquitär auftritt (Andrici et al. 2016). Diese widersprüchlichen Aussagen sowie die eigenen Ergebnisse zeigen den Forschungsbedarf bezüglich der BAP1 Expression in serösen und insbesondere in BRCA-mutierten Ovarialkarzinomen.

Auch Andrici et al. kommen zu dem Schluss, dass die Inzidenz von nukleärem BAP1 Expressionsverlust in gynäkologischen serösen Karzinomen noch nicht hinreichend erforscht wurde. In beiden Arbeiten, McGregor und Andrici et al. ist nicht klar beschrieben, nach welchem Score die Auswertung der nukleären Expression erfolgte und ist somit fraglich vergleichbar mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten IRS (0-2 negativ, 3-12 positiv). Bei Andrici et al. ist zudem unklar, ob die serösen Ovarialkarzinome auf einen BRCA-Status getestet wurden.

Abschließend sind die Ergebnisse dieser Arbeit am ehesten mit denen von McGregor vereinbar, auch wenn die nukleäre Expression (positiv bei IRS ab 3) sich auf die Gruppe der BRCA-positiven Fälle verteilt und nur in drei Fällen auftritt.

### **6.3.5 BAAT1**

BAAT1 steht für „BRCA1 associated ATM activator 1“ und bindet an die BRCT Domäne von BRCA1. Die Expression von BAAT1 zeigt sich in dieser Arbeit sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch, es liegen keine signifikanten Unterschiede in der Expression abhängig vom BRCA-Status vor. Das BAAT1-Gen und seine Proteinexpression in Ovarialkarzinomen sind von den hier untersuchten Markern am wenigsten gut erforscht. In der Literatur ist keine annähernd vergleichbare Arbeit auffindbar, die hier gefundenen Ergebnisse stellen für BAAT1 alleine keine interessante Funktion als möglichen Marker dar, BRCA-positive OVCA von BRCA-negativen zu unterscheiden.

## **6.4 Korrelationen der Proteinexpression untereinander**

Um der Frage nachzugehen, ob ein Marker oder die Kombination von mehreren Markern für die Unterscheidung zwischen BRCA-positiven und BRCA-negativen Ovarialkarzinomen hinsichtlich seiner unterschiedlichen Expression besteht, wurden anhand von Boxplots und deren ermittelten Median-Werte Zusammenhänge untersucht. Dabei erwiesen sich drei Paare als interessant.

### ***Korrelation von BAAT1 mit BAP1***

In der Gruppe der BRCA positiven Fälle zeigte sich im Hinblick auf diese Korrelation ein Zusammenhang. Eine starke BAP1-Expression geht auch mit einer starken BAAT1-Expression einher. Fälle mit einer mittleren BAAT1-Expression weisen auch eine mittlere Expression von BAP1 auf. Diese Feststellung zeigt, dass der Großteil der BRCA positiven Fälle in Bezug auf diese beiden Marker ein ähnliches zytoplasmatisches Expressionsprofil aufweist. Dies ist insofern interessant, da beide Proteinexpressionen einzeln betrachtet keine Signifikanz erbrachten, weder bezogen auf Unterschiede in der Expression zytoplasmatisch/nukleär noch in Bezug auf den Mutationsstatus. Beide Marker zusammen zeigen jedoch eine signifikante positive Korrelation zwischen dem zytoplasmatischen PpZ bezogen auf die Fälle mit Mutation ( $p = 0,014$ ,  $n = 20$ ).

Diese Erkenntnis könnte dazu führen, dass es sinnvoller ist ein Panel an Markern zu testen und aus der Summe der einzelnen möglichen Korrelationen die beste Gesamtaussage für ein Detektieren von BRCA positiven Fällen entsteht.

### ***Korrelation BAAT und FANCJ***

Auch hier zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von BAAT1 und FANCJ. Eine hohe Expression von BAAT1 ist mit einer ebenso hohen Expression von FANCJ assoziiert. Tumoren mit einer geringen Expression von FANCJ zeigen auch eine geringe BAAT1 Expression. Dieses Ergebnis bestätigt, wie oben beschrieben, dass die Kombination von Markern wichtig für das Gesamtergebnis, nämlich der Differenzierung zwischen mutierten und nicht mutierten Ovarialkarzinomen, zu sein scheint. Allerdings ist auch dieser Zusammenhang kritisch zu werten, da jeweils FANCJ und BAAT1 alleine keine signifikanten Expressionsergebnisse erbrachten.

### ***Korrelation FANCJ und HSPC142***

Hier zeigt sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der HSPC142-Expression im Zytoplasma und der FANCJ-Expression im Kern. Die BRCA-positiven Fälle, die HSPC zytoplasmatisch exprimieren, zeigen auch eine in etwa gleichwertige nukleäre Expression von FANCJ.

Für die Gesamtinterpretation der Zusammenhänge zwischen den einzelnen Markern fällt auf, dass BAAT1 und FANCJ als Marker für ein Screening der BRCA positiven Fälle interessant zu sein scheinen, vor allem wie beschrieben in Korrelation mit anderen Markern.

Abschließend ist zudem untersucht wurden ob das Alter der Patientinnen einen Einfluss auf die Proteinexpression hat. Hierfür wurden Cluster gebildet, die die Variable Alter in vier Gruppen kategorisierte. Es zeigte sich weder in der Gruppe der mutierten Fälle noch in der Gruppe der nicht mutierten Fälle eine Korrelation zwischen dem Alter und der Proteinexpression.

## **6.5 Ctlp Färbung am TMA-OVCA Panel**

### ***Ctlp in Abhängigkeit von der Histologie und dem Grading***

Die bisher analysierte Ctlp-Expression bezog sich auf Fälle mit high-grade serösen OVCAs, bei denen der BRCA-Status bekannt ist. In diesem TMA-Panel sind verschiedene histologische Subtypen vertreten, bei denen jeweils der BRCA Mutationsstatus (bis auf drei Fälle) unbekannt ist, dafür aber alle klinischen und pathologischen Daten vorlagen. Betrachtet man die Ctlp-Expression im Zytoplasma abhängig von der Histologie, so fällt auf, dass es sich bei dem Großteil der Fälle (79,48 %) mit einer hohen Expression (IRS 8-12) im Cytoplasma um high-grade seröse OVCA handelt. Da es in der vorliegenden Arbeit im HGSOVCA-Panel zu einer zytoplasmatischen Überexpression der BRCA-positiven Fälle kam und diese schlecht

differenziert waren (G3), darf angenommen werden, dass zumindest ein Teil der G3 Fälle, die im TMA positiv waren, BRCA-mutiert sein könnten. Dies würde sich insofern mit Daten aus der Literatur decken, da man inzwischen weiß, dass 70% der serösen OVCA mit positivem BRCA-Status schlecht differenziert sind und somit G3 Fälle sind (Girolimetti et al. 2014). Trotz diesen signifikanten Ergebnissen kann nicht abgestritten werden, dass durchaus auch low-grade seröse OVCA cytoplasmatisch überexprimieren. Die CtIp-Expression in Bezug auf das Grading über alle histologischen Subtypen der 299 TMA Fälle erbrachte keine Signifikanzen. Im Exakten-Test nach Fisher kann der zytoplasmatische IRS mit einem p-Wert von 0,062 lediglich auf einen Trend hinweisen.

## **6.6 Kaplan-Meier-Überlebensanalysen**

### ***Bedeutung der Ergebnisse der Überlebenskurven in Abhängigkeit von CtIp***

Anknüpfend an die oben beschriebene Überlegung, dass ein Teil der G3 Fälle mutiert ist und eine starke zytoplasmatische CtIp-Expression zeigt, sollte mit Hilfe der Überlebenskurven überprüft werden, ob diese mutierten Fälle (G3) ein besseres Überleben haben. Mit Hilfe der IR-Scores und den PpZ wurde zweifach (einmal für alle Fälle unabhängig von der Histologie und einmal für die serösen OVCA) jeweils die Abhängigkeit der CtIp-Expression zoplasmatisch/nukleär vom Überleben dargestellt. Hierbei zeigten sich keine Signifikanzen. Ein leichter Trend besteht jedoch in der Abhängigkeit der CtIp-Expression im Zytoplasma vom Überleben. (p Wert=0,073). Die Überlebensgrafik zeigt, dass eine höhere CtIp-Expression mit einer besseren Überlebensrate einhergeht.

In Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich festhalten, dass der Grundgedanke des Generierens eines Panels zur Detektion BRCA-positiver Fälle sehr sinnvoll sein könnte. In der aktuellen Literatur wird stetig nach molekularen Markern gesucht, welche durch ihre Proteinexpression schnell und zuverlässig eine Aussage über den BRCA-Mutationsstatus treffen könnten. Allerdings hat diese Suche bisher keine zufriedenstellenden Ergebnisse erbracht, was die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen. Zum einen sind die Proteine, welche mit den beiden BRCA- Genen interagieren in Teilen noch nicht vollständig in ihrer Funktion verstanden. Zum anderen wurden die hier verwendeten Antikörper in ihrem Expressionsprofil abhängig sowie auch unabhängig von einer BRCA Mutation in (serösen) Ovarialkarzinomen noch nicht hinreichend untersucht. Es liegen durchaus vereinzelt Daten für deren Expressionsprofil in Mammakarzinomen vor, allerdings fehlt in den meisten Studien die Unterscheidung der Lokalisation der

Expression im jeweiligen Zellkompartiment. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten zumindest an, dass ein Panel an molekulargenetischen Markern sinnvoller ist als ein einziger Marker allein.

## **7 Zusammenfassung und Ausblick**

Das Ovarialkarzinom ist bis heute der gynäkologische Tumor mit der höchsten Letalitätsrate (Neff et al. 2017). Trotz sinkender Inzidenz ist die Mortalität weiterhin hoch (Bray et al. 2018; Taube et al. 2019). Hauptgründe sind das Fehlen von Frühsymptomen sowie einer sensitiven Screeningmethode zum Erkennen von Ovarialkarzinomen. Ständig auf der Suche nach neuen therapeutischen Ansätzen bleibt der Standard in der Behandlung des Ovarialkarzinoms die operative Therapie in Kombination mit anschließender Chemotherapie. In Anbetracht der Tatsache, dass vor allem das high-grade seröse OVCA verstärkt mit Mutationen in verschiedenen, in Teilen bekannten Genen assoziiert ist, wird die Suche nach molekulargenetischen Markern, die solch eine Mutation verlässlich detektieren können, immer interessanter. Mit dem „TruRisk“-Panel das standardmäßig bei der NGS Analyse verwendet wird, werden derzeit 34 Gene untersucht, die im Zusammenhang mit der Entstehung von Ovarialkarzinomen stehen. Neben den Mutationen in den BRCA-Genen, die das Risiko an einem OVCA zu erkranken stark erhöhen, werden immer weitere high susceptibility genes diskutiert, die ebenfalls Einfluss auf die Entstehung von hereditärem Eierstockkrebs nehmen. Der Großteil der BRCA-assoziierten Ovarialkarzinome ist high-grade serös (G3). Bahnbrechende Neuigkeit in der Therapie des Ovarialkarzinoms war die Einführung des ersten PARP-Inhibitors Olaparib 2014. Die Zulassung war an das Vorliegen eines rezidierten high-grade serösen, platin-sensiblen, BRCA-positiven OVCA gebunden. Trotz der damit verbundenen Einschränkung in der Anwendung dieser hochspezifischen Therapie wird verdeutlicht, wie relevant das Wissen über den BRCA-Mutationsstatus für die Planung der Therapie ist. Inzwischen ist die Zulassung mit zwei neueren PARP-Inhibitoren, Nira- und Rucaparib erweitert worden, die unabhängig vom BRCA-Status eingesetzt werden dürfen. Allerdings ist die Wirksamkeit bei BRCA-positivem Mutationsstatus erheblich besser. Aufgrund der hohen Relevanz der Kenntnis des BRCA-Status für eine zielgerichtete Therapie, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob immunhistochemisch molekulare Marker etabliert werden können, die BRCA mutierte Ovarialkarzinome von nicht mutierten unterscheiden können. Bei den ausgewählten Antikörpern, welche für die immunhistochemische Analyse ausgewählt wurden, handelt es sich um HSPC142, BAP1, BAAT1, CtIp und FANCI.

Hierfür wurden zunächst immunhistochemische Färbungen an einem Kollektiv mit bekanntem BRCA-Status durchgeführt, wovon alle vierzig Fälle aufgrund eines high-grade serösen OVCA eine BRCA-Mutationsanalyse erhielten. Zwanzig Fälle hatten nach der IACR Klassifikation eine klinisch relevante BRCA-Mutation (Klasse 4 und 5), die anderen zwanzig wurden passend zu jenen Fällen gematcht, hatten aber keine klinisch relevante Mutation (Klasse 1 und 2). Aufgrund der gut untersuchten Funktion von CtIp in der homologen Rekombination, als auch beim Erhalt der genomischen Stabilität und der überzeugendsten Datenlage zum immunhistochemischen Verhalten von CtIp in verschiedene Karzinomtypen, wurde dieser Antikörper dann auch für die immunhistochemische Färbung an einem größeren Panel auf einem Tissue Microarrays (TMA) nochmals verwendet. Dieser TMA enthielt Gewebestanzungen von 299 Ovarialkarzinomen unterschiedlicher histologischer Klassifikation, deren BRCA-Status unklar war. Mit der erneuten CtIp-Färbung sollte untersucht werden, ob die gefundenen Ergebnisse der Matching-Gruppe auf dieses Panel übertragen werden können.

Zur Auswertung der Immunhistochemie wurde der IR-Score nach Remmele und Stegner verwendet und im Anschluss mit den klinischen Parametern, dem FIGO Stadium, dem Grading und dem Überleben korreliert.

Die statistische Analyse ergab für die TMAs, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen der histologischen Klassifikation, dem Grading und dem FIGO Stadium besteht. Alle drei Faktoren stehen ihrerseits im Zusammenhang mit dem Überleben. Die durchgeführte CtIp-Immunhistochemie am HGSOVCA-Panel zeigt, dass BRCA-positive high-grade seröse Ovarialkarzinome eine signifikante zytoplasmatische Überexpression im Vergleich zu BRCA-negativen Fällen zeigen. Übertragen auf das große TMA-Panel konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch hier die high-grade serösen Fälle im Zytoplasma überexprimieren. Deshalb kann vermutet werden, dass diese Fälle wahrscheinlich zum Teil BRCA-positiv sind. Im Nachhinein konnte von drei Fällen aus dem TMA-Kollektiv ein BRCA-Status erhoben werden: Dabei waren alle Fälle high-grade serös, zwei zeigen einen BRCA-negativen Status, ein Fall erbrachte einen BRCA-positiven Mutationsstatus. Statistisch verwertbar sind diese drei Angaben zum Mutationsstatus nicht. Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven ergaben keine Signifikanzen im Hinblick auf einen Zusammenhang der CtIp-Expression und dem Überleben. Lediglich folgender Trend mit einem p-Wert von 0,073 lässt sich für die zytoplasmatische CtIp-Expression im Zusammenhang mit dem Überleben verzeichnen: Eine starke zytoplasmatische CtIp-Expression scheint mit einem besseren Überleben assoziiert zu

sein. Wenn diese Fälle die zytoplasmatisch CtIp überexprimieren tatsächlich einen positiven BRCA Status aufweisen, wäre zu vermuten, dass BRCA mutierte Fälle ein besseres Überleben als BRCA-negative Fälle haben könnten. (Candido-dos-Reis et al. 2015; Bolton et al. 2012). CtIp gestaltet sich demnach als interessanter immunhistochemischer Marker, der dringend weiter an Karzinomen mit bekanntem BRCA-Status untersucht werden sollte. Dazu müssten mehr Fälle mit bekanntem BRCA-Status untersucht werden.

Des Weiteren zeigt die Korrelation der Antikörper, dass zum Auffinden aller möglichen BRCA-positiven Fälle die Kombination mehrerer Marker sinnvoller ist, als nur einen Marker anzuwenden. BAAT und FANCI stellten sich in dieser Arbeit als interessante Kombinationspartner heraus. Interessanterweise konnten diese zwei Antikörper isoliert keinen Beitrag dazu leisten, BRCA-positive Fälle durch ihr Expressionsverhalten aufzuspüren, in Kombination zeigten sich jedoch statistisch signifikante Korrelationen untereinander. Folglich wären weitere Untersuchungen mit CtIp, BAAT und FANCI sowie HSPC sinnvoll, um das spezifischste Panel für eine treffsichere Detektion der BRCA- mutierten Fälle zu etablieren.

Unabhängig von den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen zeigt die geringe Datenlage, dass die hier getesteten Marker immunhistochemisch in Ovarialkarzinomen und in solchen mit BRCA-Mutation noch nicht hinreichend untersucht worden sind. Es ist inzwischen weitreichend erforscht welche Funktionen die Proteine innerhalb des BRCA-Komplexes einnehmen und welche Fehler in der DNA-Reparatur entstehen, wenn der Ablauf der HR nicht gewährleistet ist. Allerdings existieren keine groß angelegten Studien über eine mögliche Expressionsveränderung der hier untersuchten Proteine bei BRCA-Mutation in Ovarialkarzinomen.

Der Ansatz ein Panel zum Detektieren von BRCA-Mutationen zu generieren ist nicht nur bei Karzinomen im Ovar, sondern auch bei Mamma, Pankreas und Colon Teil aktueller Forschung. Abgesehen davon eine Paneldiagnostik bei verschiedenen Tumoren anzuwenden, ist der Einsatz bei Erkrankungen, bei denen mehrere ursächliche Gene in Frage kommen und bei der sich die Mutationen heterogen auf diese verteilen, sinnvoll. Solche Erkrankungen sind zum Beispiel Kardiomyopathien als auch Bindegewbserkrankungen (Elbracht et al. 2018). Der Einzug dieser spezifischen Diagnostik geht demnach über die Onkologie hinaus und zeigt, dass vielversprechende Ergebnisse in mehr als nur einem Fachgebiet erwartet werden können.



Das vom deutschen Konsortium für familiären Brust- und Eierstockkrebs herausgebrachte „TruRisk“-Panel umfasst die wichtigsten Gene neben BRCA1 und BRCA2, die an der Entstehung von Ovarialkarzinomen beteiligt sind und wird ständig der aktuellen Forschung angepasst. Die durch Plon et al. eingeführte Klassifikation der Mutationen betitelt Fälle, in denen die Pathogenität nicht klar zuzuordnen ist als VUS (variant of unknown significance). Auch wenn in den BRCA-Genen nur 5% der Gene als VUS identifiziert werden, sind sich sämtliche an der Mutationsanalyse beteiligten Zentren einig, dass die VUS-Rate reduziert werden muss. Die hierfür gegründete „VUS task force“ beinhaltet eine Art Recallsystem und wurde durch das deutsche Konsortium einberufen. Hier wird entschieden, was die Entdeckung eines VUS für den Patienten und die Behandlung bedeutet, sollte nachträglich eine Pathogenität der Mutation nachgewiesen werden. Der Patient wird informiert und zur neu entstandenen Situation umfassend beraten (Rhiem und Schmutzler 2018). Desweiteren liegen nicht für alle Gene, die bei der Mutationsanalyse neben den BRCA-Genen untersucht werden, Daten zum altersabhängigen Erkrankungsrisiko vor, sodass eine individuelle Beratung je nach Mutationsort erfolgen muss.

In naher Zukunft wird erwartet, dass sich die kostenseitige Vergünstigung sowie Beschleunigung in der Durchführung der Mutationsanalyse weiter fortsetzen wird. Jedoch bleibt der Zugang zu diesem Verfahren weiterhin nicht jeder Patientin gewährt, da nur wenige spezialisierte Zentren Mutationsanalysen durchführen. Vorteil des Detektierens eines möglichen BRCA-Status durch immunhistochemische Marker ist das ubiquitäre Vorhandensein der Immunhistochemie sowie dessen schnelle Durchführung. Durch die Paneldiagnostik wird die BRCA-Mutation vorerst nicht weiter klassifiziert in Keimbahn- oder somatische Mutation, da der direkte Therapiebeginn mit PARP-Inhibitoren vom BRCA-Status abhängig ist und nicht von der Art der Mutation. Die Untersuchung des Tumorgewebes fällt nicht unter das Gendiagnostikgesetz, daher werden betroffene Patienten weniger umfassend aufgeklärt als bei der Keimbahntestung. Eine mögliche Anwendbarkeit des Gendiagnostikgesetzes auf somatische Mutationen, von welchen auf Keimbahnmutationen rückgeschlossen werden kann, wird von Selbsthilfegruppen wie dem BRCA-Netzwerk gefordert. Da 80% der BRCA-positiven Mutationen keimbahnassoziiert sind, muss die Patientin über die Nachsorge sowie die Disposition für andere Tumore aufgeklärt werden. Nicht zuletzt sind bei einer Keimbahnmutation Angehörige zu informieren. Es bleibt abzuwarten, ob der Gesetzgeber für den Schutz des Patienten und seiner Daten, einer Benachteiligung durch Dritte und

der Wahrung seiner Selbstbestimmung die Anwendung des Gendiagnostikgesetzes auf somatische Mutationen ausweiten wird.

## 8 Literaturverzeichnis

### Literaturverzeichnis

Aglipay, Jason A.; Martin, Sarah A.; Tawara, Hideyuki; Lee, Sam W.; Ouchi, Toru (2006): ATM activation by ionizing radiation requires BRCA1-associated BAAT1. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (14), S. 9710–9718. DOI: 10.1074/jbc.M510332200.

Aivazova-Fuchs, V.; Friese, K. (2017): Erhaltungstherapie bei metastasierten gynäkologischen Malignomen. In: *Der Gynäkologe* 50 (5), S. 320–326. DOI: 10.1007/s00129-017-4071-x.

Andrici, Juliana; Jung, Jason; Sheen, Amy; D’Urso, Lisa; Sioson, Loretta; Pickett, Justine et al. (2016): Loss of BAP1 expression is very rare in peritoneal and gynecologic serous adenocarcinomas and can be useful in the differential diagnosis with abdominal mesothelioma. In: *Human Pathology* 51, S. 9–15. DOI: 10.1016/j.humpath.2015.12.012.

Aparicio, Tomas; Gautier, Jean (2016): BRCA1-CtIP interaction in the repair of DNA double-strand breaks. In: *Molecular & cellular oncology* 3 (4), e1169343. DOI: 10.1080/23723556.2016.1169343.

Baer, R. (2002): The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. In: *Current Opinion in Genetics & Development* 12 (1), S. 86–91. DOI: 10.1016/S0959-437X(01)00269-6.

Bauer, Peter; Hummel, Michael; Kalle, Christof von; Schmutzler, Rita; Block, Andreas; Stroth, Matthias et al. (2016): Molekulargenetische Diagnostik - Was wissen die Maschinen? Was wollen wir wissen? In: *Oncology research and treatment* 39 Suppl 2, S. 2–23. DOI: 10.1159/000447548.

Benson, F. E.; Stasiak, A.; West, S. C. (1994): Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA. In: *The EMBO Journal* 13 (23), S. 5764–5771.

Beral, V.; Hermon, C.; Kay, C.; Hannaford, P.; Darby, S.; Reeves, G. (1999): Mortality associated with oral contraceptive use. 25 year follow up of cohort of 46 000 women from Royal College of General Practitioners' oral contraception study. In: *BMJ* 318 (7176), S. 96–100. DOI: 10.1136/bmj.318.7176.96.

- Bertwistle, David; Ashworth, Alan (1998): Functions of the BRCA1 and BRCA2 genes. In: *Current Opinion in Genetics & Development* 8 (1), S. 14–20. DOI: 10.1016/S0959-437X(98)80056-7.
- Bischoff, Angelika (2018): PARP-Inhibition beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom. In: *Im Focus Onkologie* 21 (11), S. 45–46. DOI: 10.1007/s15015-018-4287-1.
- Blassl, C. (2012): Übersicht - Epidemiologie und Ätiologie des Ovarialkarzinoms. In: *Tumordiagnostik & Therapie* 33 (05), S. 251–255.
- Blickenstorfer, Kerstin; Leeners, Brigitte (2017): Menopausale Hormontherapie — ein Update. In: *gynäkologie + geburtshilfe* 22 (2), S. 32–38. DOI: 10.1007/s15013-017-1050-1.
- Bolton, Kelly L.; Chenevix-Trench, Georgia; Goh, Cindy; Sadetzki, Siegal; Ramus, Susan J.; Karlan, Beth Y. et al. (2012): Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. In: *JAMA* 307 (4), S. 382–390. DOI: 10.1001/jama.2012.20.
- Bolton, Kelly L.; Tyrer, Jonathan; Song, Honglin; Ramus, Susan J.; Notaridou, Maria; Jones, Chris et al. (2010): Common variants at 19p13 are associated with susceptibility to ovarian cancer. In: *ng* 42 (10), S. 880–884. DOI: 10.1038/ng.666.
- Boulton, S. J. (2006): Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. In: *Biochemical Society transactions* 34 (Pt 5), S. 633–645. DOI: 10.1042/BST0340633.
- Bray, Freddie; Ferlay, Jacques; Soerjomataram, Isabelle; Siegel, Rebecca L.; Torre, Lindsey A.; Jemal, Ahmedin (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 68 (6), S. 394–424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- Burges, Alexander; Schmalfeldt, Barbara (2011): Ovarian cancer: diagnosis and treatment. In: *Deutsches Ärzteblatt International* 108 (38), S. 635–641. DOI: 10.3238/arztebl.2011.0635.
- Candido-dos-Reis, Francisco J.; Song, Honglin; Goode, Ellen L.; Cunningham, Julie M.; Fridley, Brooke L.; Larson, Melissa C. et al. (2015): Germline mutation in BRCA1 or BRCA2 and ten-year survival for women diagnosed with epithelial ovarian cancer. In: *Clinical Cancer Research* 21 (3), S. 652–657. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2497.

Carbone, Michele; Yang, Haining; Pass, Harvey I.; Krausz, Thomas; Testa, Joseph R.; Gaudino, Giovanni (2013): BAP1 and cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 13 (3), S. 153–159. DOI: 10.1038/nrc3459.

Chi, Dennis S.; McCaughy, Kristina; Diaz, John P.; Huh, Jae; Schwabenbauer, Sarah; Hummer, Amanda J. et al. (2006): Guidelines and selection criteria for secondary cytoreductive surgery in patients with recurrent, platinum- sensitive epithelial ovarian carcinoma. In: *Cancer* 106 (9), S. 1933–1939. DOI: 10.1002/cncr.21845.

Chinnadurai, G. (2006): CtIP, a candidate tumor susceptibility gene is a team player with luminaries. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1765 (1), S. 67–73. DOI: 10.1016/j.bbcan.2005.09.002.

Chundury, Anupama; Apicelli, Anthony; DeWees, Todd; Powell, Matthew; Mutch, David; Thaker, Premal et al. (2016): Intensity modulated radiation therapy for recurrent ovarian cancer refractory to chemotherapy. In: *Gynecologic oncology* 141 (1), S. 134–139. DOI: 10.1016/j.ygyno.2016.02.005.

Coleman, Robert L.; Oza, Amit M.; Lorusso, Domenica; Aghajanian, Carol; Oaknin, Ana; Dean, Andrew et al. (2017): Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. In: *The Lancet* 390 (10106), S. 1949–1961. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32440-6.

Darb-Esfahani, S.; Denkert, C.; Dietel, M.: Aktuelle Aspekte zur Tumorigenese und Ätiologie. In: *Onkologie* 20 (7), S. 642–649. DOI: 10.1007/s00761-014-2682-6.

D'Argenio, Valeria; Esposito, Maria Valeria; Telese, Antonella; Precone, Vincenza; Starnone, Flavio; Nunziato, Marcella et al. (2015): The molecular analysis of BRCA1 and BRCA2: Next-generation sequencing supersedes conventional approaches. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 446, S. 221–225. DOI: 10.1016/j.cca.2015.03.045.

Deng, Chu-Xia (2006): BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. In: *Nucleic acids research* 34 (5), S. 1416–1426. DOI: 10.1093/nar/gkl010.

Deng, Chu-Xia; Brodie, Steven G. (2000): Roles of BRCA1 and its interacting proteins. In: *Bioessays* 22 (8), S. 728–737. DOI: 10.1002/1521-1878(200008)22:8<728::AID-BIES6>3.0.CO;2-B.

Domchek, Susan M.; Friebel, Tara M.; Singer, Christian F.; Evans, D. Gareth; Lynch, Henry T.; Isaacs, Claudine et al. (2010): Association of Risk-Reducing Surgery in BRCA1 or BRCA2 Mutation Carriers With Cancer Risk and Mortality. In: *JAMA* 304 (9), S. 967–975. DOI: 10.1001/jama.2010.1237.

Drost, Rinske; Bouwman, Peter; Rottenberg, Sven; Boon, Ute; Schut, Eva; Klarenbeek, Sjoerd et al. (2011): BRCA1 RING Function Is Essential for Tumor Suppression but Dispensable for Therapy Resistance. In: *Cancer cell* 20 (6), S. 797–809. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.11.014.

Du Bois, Andreas; Reuss, Alexander; Pujade- Lauraine, Eric; Harter, Philipp; Ray-Coquard, Isabelle; Pfisterer, Jacobus (2009): Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: A combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials. In: *Cancer* 115 (6), S. 1234–1244. DOI: 10.1002/cncr.24149.

Dudenhausen, J. W. (2002): Frauenheilkunde und Geburtshilfe: De Gruyter. Online verfügbar unter [https://books.google.de/books?id=1ldVrgL-\\_dAC](https://books.google.de/books?id=1ldVrgL-_dAC).

Ebell, Mark H.; Culp, MaryBeth B.; Radke, Taylor J. (2016): A Systematic Review of Symptoms for the Diagnosis of Ovarian Cancer. In: *American Journal of Preventive Medicine* 50 (3), S. 384–394. DOI: 10.1016/j.amepre.2015.09.023.

Elbracht, M.; Meyer, R.; Eggermann, T.; Kurth, I. (2018): Rationaler Einsatz genetischer Tests in der Inneren Medizin. In: *Der Internist* 59 (8), S. 756–765. DOI: 10.1007/s00108-018-0457-7.

Engel, J. B.; Ortmann, O. (2012): Endokrine Therapie des Ovarialkarzinoms. In: *Der Gynäkologe* 45 (8), S. 613–617. DOI: 10.1007/s00129-011-2927-z.

Farmer, Hannah; McCabe, Nuala; Lord, Christopher J.; Tutt, Andrew N. J.; Johnson, Damian A.; Richardson, Tobias B. et al. (2005): Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. In: *Nature* 434 (7035), S. 917–921. DOI: 10.1038/nature03445.

Fehm, Tanja; Fugunt, Regina; Bachmann, Cornelia; Marmé, Alexander; Gardanis, Kostantinos; Solomayer, Erich; Grischke, Eva-Maria (2013): Eierstockkrebs. Therapie des primären Ovarialkarzinoms. In: *Geburtshilfe Frauenheilkd* 73 (06), S. 550–553. DOI: 10.1055/s-0032-1328465.

- Feng, Lin; Huang, Jun; Chen, Junjie (2009): MERIT40 facilitates BRCA1 localization and DNA damage repair. In: *Genes & development* 23 (6), S. 719–728. DOI: 10.1101/gad.1770609.
- Fradet-Turcotte, Amelie; Sitz, Justine; Grapton, Damien; Orthwein, Alexandre (2016): BRCA2 functions: from DNA repair to replication fork stabilization. In: *Endocrine-related cancer* 23 (10), T1-T17. DOI: 10.1530/ERC-16-0297.
- Fusco, C.; Reymond, A.; Zervos, A. S. (1998): Molecular cloning and characterization of a novel retinoblastoma-binding protein. In: *Genomics* 51 (3), S. 351–358. DOI: 10.1006/geno.1998.5368.
- Girolimetti, Giulia; Perrone, Anna Myriam; Santini, Donatella; Barbieri, Elena; Guerra, Flora; Ferrari, Simona et al. (2014): BRCA-Associated Ovarian Cancer. From Molecular Genetics to Risk Management. In: *BioMed Research International* 2014 (7), S. 1–11. DOI: 10.1155/2014/787143.
- Godet, Inês; Gilkes, Daniele M. (2017): BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. In: *Integrative cancer science and therapeutics* 4 (1).
- Gorodetska, Ielizaveta; Kozeretka, Iryna; Dubrovskaya, Anna (2019): BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. In: *Journal of Cancer* 10 (9), S. 2109–2127. DOI: 10.7150/jca.30410.
- Gregorio, Nikolau de (2018): Meilensteine in der Therapie des Ovarialkarzinoms. In: *TumorDiagn u Ther* 39 (03), S. 177–179. DOI: 10.1055/a-0574-5207.
- Guénard, F.; Durocher, F. (2011): BAP1 (BRCA1 associated protein-1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase)). In: *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* (7). DOI: 10.4267/2042/44801.
- Györfy, Balázs; Lánckzy, András; Szállási, Zoltán (2012): Implementing an online tool for genome-wide validation of survival-associated biomarkers in ovarian-cancer using microarray data from 1287 patients. In: *Endocrine-related cancer* 19 (2), S. 197–208. DOI: 10.1530/ERC-11-0329.
- Han, Wenyan; Zhang, Yiqun; Niu, Cong; Guo, Jieyu; Li, Jiajia; Wei, Xiangxiang et al. (2019): BTB and CNC homology 1 (Bach1) promotes human ovarian cancer cell metastasis by HMGA2-mediated epithelial-mesenchymal transition. In: *Cancer Letters* 445, S. 45–56. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.01.003.

- Harris, Janelle L.; Khanna, Kum Kum (2011): BRCA1 A-complex fine tunes repair functions of BRCA1. In: *Aging* 3 (5), S. 461–463. DOI: 10.18632/aging.100334.
- Hashizume, Rintaro; Fukuda, Mamoru; Maeda, Ichiro; Nishikawa, Hiroyuki; Oyake, Daisuke; Yabuki, Yukari et al. (2001): The RING Heterodimer BRCA1-BARD1 Is a Ubiquitin Ligase Inactivated by a Breast Cancer-derived Mutation. In: *J. Biol. Chem.* 276 (18), S. 14537–14540. DOI: 10.1074/jbc.C000881200.
- Heine, George F.; Parvin, Jeffrey D. (2007): BRCA1 control of steroid receptor ubiquitination. In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2007 (391), pe34. DOI: 10.1126/stke.3912007pe34.
- Hillemanns, P. (2014): Symposium-Dokumentation 2. Früherkennung von gynäkologischen Tumoren – ein Update. In: *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 74 (06), S. 525–528.
- Huen, Michael S.Y.; Grant, Robert; Manke, Isaac; Minn, Kay; Yu, Xiaochun; Yaffe, Michael B.; Chen, Junjie (2007): RNF8 Transduces the DNA-Damage Signal via Histone Ubiquitylation and Checkpoint Protein Assembly. In: *Cell* 131 (5), S. 901–914. DOI: 10.1016/j.cell.2007.09.041.
- Huyton, Trevor; Bates, Paul A.; Zhang, Xiaodong; Sternberg, Michael J.E; Freemont, Paul S. (2000): The BRCA1 C-terminal domain. Structure and function. In: *Mutation Research/DNA Repair* 460 (3-4), S. 319–332. DOI: 10.1016/S0921-8777(00)00034-3.
- Immunhistochemie (2006). In: Gudrun Lang (Hg.): Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. Vienna: Springer-Verlag/Wien, S. 257–294.
- Integrated Genomic Analyses of Ovarian Carcinoma (2011). In: *Nature* 474 (7353), S. 609–615.
- Jaeger, Anna; Wölber, Linn; Prieske, Katharina; Schmalfeldt, Barbara (2018): Genetik und Prävention des Ovarialkarzinoms. In: *TumorDiagn u Ther* 39 (03), S. 165–170. DOI: 10.1055/a-0574-5187.
- Jensen, Ryan B. (2013): BRCA2: One Small Step for DNA Repair, One Giant Protein Purified. In: *The Yale Journal of Biology and Medicine* 86 (4), S. 479–489.
- JENSEN, DAVID E.; RAUSCHER, FRANK J. (1999): BAP1, a Candidate Tumor Suppressor Protein That Interacts with BRCA1. In: *Annals NY Acad Sci* 886 (1 ANTICANCER MO), S. 191–194. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb09414.x.



Jiang, Qinqin; Paramasivam, Manikandan; Aressy, Bernadette; Wu, Junmin; Bellani, Marina; Tong, Wei et al. (2015): MERIT40 cooperates with BRCA2 to resolve DNA interstrand cross-links. In: *Genes & development* 29 (18), S. 1955–1968. DOI: 10.1101/gad.264192.115.

Kaatsch, Peter; Spix, Claudia; Katalinic, Alexander; Hentschel, Stefan; Luttmann, Sabine; Stegmaier, Christa et al. (2015): Krebs in Deutschland 2011/2012, 16.12.2015. Online verfügbar unter [http://edoc.rki.de/documents/rki\\_fv/reC4OftzrdIts/PDF/228lO1Z2uKVg.pdf](http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/reC4OftzrdIts/PDF/228lO1Z2uKVg.pdf).

Kalb, Reinhard; Mallery, Donna L.; Larkin, Conor; Huang, Jeffrey T.J.; Hiom, Kevin (2014): BRCA1 Is a Histone-H2A-Specific Ubiquitin Ligase. In: *Cell Reports* 8 (4), S. 999–1005. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.07.025.

Kanzow, M.; van Mackelenbergh, M.; Maass, N.; Bauerschlag, D. (2018): Diagnostik und Therapie des Ovarialkarzinoms. In: *Der Onkologe* 24 (4), S. 343–356. DOI: 10.1007/s00761-018-0363-6.

Katsuki, Yoko; Takata, Minoru (2016): Defects in homologous recombination repair behind the human diseases: FA and HBOC. In: *Endocrine-related cancer* 23 (10), T19-T37. DOI: 10.1530/ERC-16-0221.

Kerr, Peter; Ashworth, Alan (2001): New complexities for BRCA1 and BRCA2. In: *Current Biology* 11 (16), R668-R676. DOI: 10.1016/S0960-9822(01)00389-X.

Kieseritzky, Kathrin von; Mahner, Sven; Trillsch, Fabian (2017): Ovarialkarzinom: Neoadjuvante Chemotherapie versus primäre zytoreduktive Operation. In: *Im Focus Onkologie* 20 (5), S. 28–29. DOI: 10.1007/s15015-017-3301-3.

Kim, Hongtae; Chen, Junjie; Yu, Xiaochun (2007): Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response. In: *Science (New York, N.Y.)* 316 (5828), S. 1202–1205. DOI: 10.1126/science.1139621.

Knudson, Alfred G. (1971): Mutation and Cancer. Statistical Study of Retinoblastoma. In: *PNAS* 68 (4), S. 820–823. Online verfügbar unter <http://www.pnas.org/content/68/4/820.full.pdf>.

Kolas, Nadine K.; Chapman, J. Ross; Nakada, Shinichiro; Ylanko, Jarkko; Chahwan, Richard; Sweeney, Frédéric D. et al. (2007): Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. In: *Science (New York, N.Y.)* 318 (5856), S. 1637–1640. DOI: 10.1126/science.1150034.

Kommoss, Stefan; Eckle, Veit-Simon; Oberlechner, Ernst; Abele, Harald; Krämer, Bernhard; Brucker, Sara Y. (2016): Operative Therapie des Ovarialkarzinoms. In: *Frauenheilkunde up2date* 10 (01), S. 15–29. DOI: 10.1055/s-0041-111473.

Kroeger, Paul T., JR; Drapkin, Ronny (2017): Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer. In: *Current opinion in obstetrics & gynecology* 29 (1), S. 26–34. DOI: 10.1097/GCO.0000000000000340.

Krome, Susanne (2018): Mamma- und Ovarialkarzinom. In: *Onkologische Welt* 09 (05), S. 212. DOI: 10.1055/s-0038-1677579.

Kuhn, Walther; Keyver-Paik, Mignon-Denise (2019): Palliative Chirurgie des Ovarialkarzinoms. In: Michael Ghadimi, Kia Homayounfar und Jörg C. Kalff (Hg.): *Palliative Viszeralchirurgie. Chirurgisches und Perioperatives Management*. Berlin, Heidelberg: Springer, S. 311–323. Online verfügbar unter [https://doi.org/10.1007/978-3-662-57362-4\\_25](https://doi.org/10.1007/978-3-662-57362-4_25).

Kurman, Robert J.; Shih, Ie-Ming (2011): Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer—Shifting the paradigm. In: *Human Pathology* 42 (7), S. 918–931. DOI: 10.1016/j.humpath.2011.03.003.

Kurman, Robert J.; Shih, Ie-Ming (2016): The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. In: *The American Journal of Pathology* 186 (4), S. 733–747. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.11.011.

Kuschel, B.; Sinz, S.; Schmalfeldt, B.; Kiechle, M. (2009): Hereditäres Ovarialkarzinom. In: Rolf Kreienberg, Andreas Bois, Jacobus Pfisterer, Sabine Schindelmann und Barbara Schmalfeldt (Hg.): *Management des Ovarialkarzinoms. Interdisziplinäres Vorgehen*. Heidelberg: Springer (Onkologie aktuell), S. 125–131.

Lax, S. F. (2017): Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom. In: *Der Pathologe* 38 (3), S. 149–155. DOI: 10.1007/s00292-017-0298-5.

Leinert, Elena; Ernst, Kristina; Schwentner, Lukas; Bekes, Inga; Fink, Visnja; Janni, Wolfgang (2017): Risikoadaptierte Betreuungskonzepte bei Mammakarzinom-Hochrisikopatientinnen. In: *TumorDiagn u Ther* 38 (04), S. 231–234. DOI: 10.1055/s-0043-103178.

Leinert, Elena; Ernst, Kristina; Schwentner, Lukas; Bekes, Inga; Fink, Visnja; Janni, Wolfgang (2018): Risikoadaptierte Betreuungskonzepte bei Mammakarzinom-Hochrisikopatientinnen. In: *Geburtshilfe Frauenheilkd* 78 (11), S. 1043–1046. DOI: 10.1055/s-0044-102033.

Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe (Hg.) (2019): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. Kurzversion 3.0 Januar 2019.

Levanon, K.; Ng, V.; Piao, H. Y.; Zhang, Yi; Chang, M. C.; Roh, M. H. et al. (2010): Primary *ex vivo* cultures of human fallopian tube epithelium as a model for serous ovarian carcinogenesis. In: *onc* 29 (8), S. 1103–1113. DOI: 10.1038/onc.2009.402.

Lheureux, Stephanie; Gourley, Charlie; Vergote, Ignace; Oza, Amit M. (2019): Epithelial ovarian cancer. In: *The Lancet* 393 (10177), S. 1240–1253. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32552-2.

Li, Yunhui; Luo, Kuntian; Yin, Yujiao; Wu, Chenming; Deng, Min; Li, Lei et al.: USP13 regulates the RAP80-BRCA1 complex dependent DNA damage response. In: *ncomms* 8, S. 15752. DOI: 10.1038/ncomms15752.

Löser, H.; Heydt, C.; Büttner, R.; Markiefka, B.: BRCA-Diagnostik an Ovarialkarzinomen. In: *Pathologe* 38 (2), S. 117–126. DOI: 10.1007/s00292-017-0274-0.

Mahner, S.; Schwarz, J.; Jänicke, F. (2009): Früherkennung, Vorsorge und Prophylaxe. In: Rolf Kreienberg, Andreas Bois, Jacobus Pfisterer, Sabine Schindelmann und Barbara Schmalfeldt (Hg.): Management des Ovarialkarzinoms. Interdisziplinäres Vorgehen. Heidelberg: Springer (Onkologie aktuell), S. 59–69.

Mailand, Niels; Bekker-Jensen, Simon; Faustrup, Helene; Melander, Fredrik; Bartek, Jiri; Lukas, Claudia; Lukas, Jiri (2007): RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. In: *Cell* 131 (5), S. 887–900. DOI: 10.1016/j.cell.2007.09.040.

Mallery, D. L. (2002): Activation of the E3 ligase function of the BRCA1/BARD1 complex by polyubiquitin chains. In: *The EMBO Journal* 21 (24), S. 6755–6762. DOI: 10.1093/emboj/cdf691.

Malpica, Anais; Deavers, Michael T.; Lu, Karen; Bodurka, Diane C.; Atkinson, Edward N.; Gershenson, David M.; Silva, Elvio G. (2004): Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. In: *The American journal of surgical pathology* 28 (4), S. 496–504.

Marmé, Frederik; Harter, Philipp; Ataseven, Beyhan (2019): Medikamentöse Therapie des Ovarialkarzinoms in der Primär- und Rezidivsituation. In: *Der Onkologe* 25 (2), S. 131–144. DOI: 10.1007/s00761-018-0511-z.

- McGregor, Stephanie; Romero, Iris; Lastra, Ricardo (2016): BAP1 Expression Is Preserved in BRCA -Associated Serous Carcinoma of the Ovary. In: *Am J Clin Pathol* 146 (suppl\_1). DOI: 10.1093/ajcp/aqw161.034.
- Meindl, Alfons; Ditsch, Nina; Kast, Karin; Rhiem, Kerstin; Schmutzler, Rita K. (2011): Hereditary Breast and Ovarian Cancer: New Genes, New Treatments, New Concepts. In: *Deutsches Ärzteblatt International* 108 (19), S. 323–330. DOI: 10.3238/arztebl.2011.0323.
- Mijnes, Jolein; Veeck, Jürgen; Gaisa, Nadine T.; Burghardt, Eduard; Ruijter, Tim C. de; Gostek, Sonja et al. (2018): Promoter methylation of DNA damage repair (DDR) genes in human tumor entities: RBBP8 / CtIP is almost exclusively methylated in bladder cancer. In: *Clin Epigenet* 10 (1), S. 1–20. DOI: 10.1186/s13148-018-0447-6.
- Mirza, Mansoor R.; Monk, Bradley J.; Herrstedt, Jørn; Oza, Amit M.; Mahner, Sven; Redondo, Andrés et al. (2016): Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. In: *The New England journal of medicine* 375 (22), S. 2154–2164. DOI: 10.1056/NEJMoa1611310.
- Moes-Sosnowska, Joanna; Rzepecka, Iwona K.; Chodzyska, Joanna; Dansonka-Mieszkowska, Agnieszka; Szafron, Lukasz M.; Balabas, Aneta et al. (2019): Clinical importance of FANCD2, BRIP1, BRCA1, BRCA2 and FANCF expression in ovarian carcinomas. In: *Cancer Biology & Therapy* 20 (6), S. 843–854. DOI: 10.1080/15384047.2019.1579955.
- Moog, U.; Rieß, O. (2014): Medizinische Genetik für die Praxis: Diagnostik, Beratung, Fallbeispiele: Thieme. Online verfügbar unter [https://books.google.de/books?id=\\_537AwAAQBAJ](https://books.google.de/books?id=_537AwAAQBAJ).
- Moynahan, Mary Ellen; Jasin, Maria (2010): Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 11 (3), S. 196–207. DOI: 10.1038/nrm2851.
- Neff, Robert T.; Senter, Leigha; Salani, Ritu (2017): BRCA mutation in ovarian cancer: testing, implications and treatment considerations. In: *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 9 (8), S. 519–531. DOI: 10.1177/1758834017714993.
- O'Donovan, Peter J.; Livingston, David M. (2010): BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. In: *Carcinogenesis* 31 (6), S. 961–967. DOI: 10.1093/carcin/bgq069.

- Ouchi, Mutsuko; Ouchi, Toru; Gelman, Irwin H.; Sudol, Marius (2010): Regulation of ATM/DNA-PKcs Phosphorylation by BRCA1-Associated BAAT1. In: *Genes & Cancer* 1 (12), S. 1211–1214. DOI: 10.1177/1947601911404222.
- Ouhtit, Allal; Gupta, Ishita; Shaikh, Zoya (2016): BRIP1, a potential candidate gene in development of non-BRCA1/2 breast cancer. In: *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 8, S. 289–298.
- Panier, Stephanie; Durocher, Daniel (2009): Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks. In: *DNA Repair* 8 (4), S. 436–443. DOI: 10.1016/j.dnarep.2009.01.013.
- Paul, Arindam; Paul, Soumen (2014): The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. In: *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 19, S. 605–618.
- Peng, Min; Litman, Rachel; Xie, Jenny; Sharma, Sudha; Brosh, Robert M.; Cantor, Sharon B. (2007): The FANCI/MutLalpha interaction is required for correction of the cross-link response in FA-J cells. In: *The EMBO Journal* 26 (13), S. 3238–3249. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601754.
- Petru, Edgar; Mörtl, Manfred; Kolovetsiou-Kreiner, Vassiliki (2017): Lebensqualität durch Früherkennung und Vorsorge gynäkologischer Tumoren. In: Rudolf Likar, Günther Bernatzky, Georg Pinter, Wolfgang Pipam, Herbert Janig und Anton Sadjak (Hg.): *Lebensqualität im Alter. Therapie und Prophylaxe von Altersleiden*. 2. Auflage. Berlin, Germany: Springer, S. 327–333. Online verfügbar unter [https://doi.org/10.1007/978-3-662-53101-3\\_30](https://doi.org/10.1007/978-3-662-53101-3_30).
- Pfisterer, J.; Du Bois, A. (2002): *Das Ovarialkarzinom. Therapeutische Standards - klinische Empfehlungen ; 16 Tabellen*. Thieme. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=baBG6gykX6UC>.
- Piek, J. M.; van Diest, P. J.; Zweemer, R. P.; Jansen, J. W.; Poort-Keesom, R. J.; Menko, F. H. et al. (2001): Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. In: *The Journal of pathology* 195 (4), S. 451–456. DOI: 10.1002/path.1000.
- Plon, Sharon E.; Eccles, Diana M.; Easton, Douglas; Foulkes, William D.; Genuardi, Maurizio; Greenblatt, Marc S. et al. (2008): Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. In: *Human Mutation* 29 (11), S. 1282–1291. DOI: 10.1002/humu.20880.

- Polo, Sophie E.; Jackson, Stephen P. (2011): Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. In: *Genes & development* 25 (5), S. 409–433. DOI: 10.1101/gad.2021311.
- Priesshof, B.; Costa, S. D. (2006): Genetische Beratung bei gynäkologischen Erkrankungen. In: Serban D. Costa, Anton Scharl und Manfred Kaufmann (Hg.): Die Gynäkologie. 2., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin: Springer (Springer E-book Collection), S. 579–584.
- Quaye, Lydia; Dafou, Dimitra; Ramus, Susan J.; Song, Honglin; Maharaj, Aleksandra Gentry; Notaridou, Maria et al. (2009): Functional complementation studies identify candidate genes and common genetic variants associated with ovarian cancer survival. In: *Hum Mol Genet* 18 (10), S. 1869–1878. DOI: 10.1093/hmg/ddp107.
- Remmele, W.; Stegner, H. E. (1987): Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. In: *Der Pathologe* 8 (3), S. 138–140.
- Rhiem, K.; Schmutzler, R. K. (2018): Flächendeckende Versorgung von Familien mit erblichem Brust- und Eierstockkrebs. In: *Der Gynäkologe* 51 (5), S. 403–408. DOI: 10.1007/s00129-018-4234-4.
- Rhiem, K. M.; Pfeifer, K. (2014): Prophylaktische Operationen. In: *Der Gynäkologe* 47 (10), S. 741–745. DOI: 10.1007/s00129-014-3347-7.
- Rhiem, Kerstin: Präventive operative Optionen für Frauen mit einer familiären Brust- und Eierstockkrebsbelastung. In: *medgen* 27 (2), S. 231–236. DOI: 10.1007/s11825-015-0046-2.
- Robert Koch Institut (Hg.) (2017): Zentrum für Krebsregisterdaten. Online verfügbar unter [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_node.html).
- Roy, Rohini; Chun, Jarin; Powell, Simon N. (2012a): BRCA1 and BRCA2. Different roles in a common pathway of genome protection. In: *Nature Reviews Cancer* 12 (1), S. 68–78. DOI: 10.1038/nrc3181.
- Roy, Rohini; Chun, Jarin; Powell, Simon N. (2012b): BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. In: *nrc* 12 (1), S. 68–78. DOI: 10.1038/nrc3181.
- Runnebaum, I. B. (2009): Molekularbiologie und Tumorentstehung. In: Rolf Kreienberg, Andreas Bois, Jacobus Pfisterer, Sabine Schindelmann und Barbara Schmalfeldt (Hg.):

Management des Ovarialkarzinoms. Interdisziplinäres Vorgehen. Heidelberg: Springer (Onkologie aktuell), S. 23–30.

Sailer, Marco et al (2016): 14 Reizdarmsyndrom: Thieme Verlag (Expertise Koloproktologie). Online verfügbar unter <http://www.thieme-connect.de/products/ebooks/pdf/10.1055/b-0036-134250.pdf>.

Schmalfeldt, B.; Seck, K.: Ovarialkarzinom. In: *Gynäkologe* 46 (8), S. 531–535. DOI: 10.1007/s00129-012-3109-3.

Schmalfeldt, B.; Seck, K. (2013): Ovarialkarzinom. In: *Gynäkologe* 46 (8), S. 531–535. DOI: 10.1007/s00129-012-3109-3.

Schmutzler, Rita (2017): Konsensusempfehlung des Deutschen Konsortiums Familiärer Brust- und Eierstockkrebs zum Umgang mit Ergebnissen der Multigenanalyse. In: *Geburtshilfe Frauenheilkd* 77 (07), S. 733–739. DOI: 10.1055/s-0043-108531.

Scully, Ralph; Chen, Junjie; Ochs, Robert L.; Keegan, Kathleen; Hoekstra, Merl; Feunteun, Jean; Livingston, David M. (1997): Dynamic Changes of BRCA1 Subnuclear Location and Phosphorylation State Are Initiated by DNA Damage. In: *Cell* 90 (3), S. 425–435. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80503-6.

Seck, Katharina; Schmalfeldt, Barbara (2016): Aktuelle Behandlungsstrategien für das fortgeschrittene Ovarialkarzinom. In: *Info Onkologie* 19 (1), S. 34–42. DOI: 10.1007/s15004-016-5202-6.

Sehdev, Ann Smith; Kurman, Robert J.; Kuhn, Elisabetta; Shih, Ie-Ming (2010): Serous tubal intraepithelial carcinoma upregulates markers associated with high-grade serous carcinomas including Rsf-1 (HBXAP), cyclin E and fatty acid synthase. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 23 (6), S. 844–855. DOI: 10.1038/modpathol.2010.60.

Sehouli, J.; Höffken, K. (2019): Ovarialkarzinom. In: *Der Onkologe* 25 (2), S. 88–89. DOI: 10.1007/s00761-018-0512-y.

Shao, Genze; Patterson-Fortin, Jeffrey; Messick, Troy E.; Feng, Dan; Shanbhag, Niraj; Wang, Yingqun; Greenberg, Roger A. (2009): MERIT40 controls BRCA1-Rap80 complex integrity and recruitment to DNA double-strand breaks. In: *Genes & development* 23 (6), S. 740–754. DOI: 10.1101/gad.1739609.

Shimizu, Y.; Kamoi, S.; Amada, S.; Hasumi, K.; Akiyama, F.; Silverberg, S. G. (1998): Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma.

I. Prognostic significance of histopathologic features--problems involved in the architectural grading system. In: *Gynecologic oncology* 70 (1), S. 2–12. DOI: 10.1006/gyno.1998.5051.

Silverberg, S. G. (2000): Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. In: *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 19 (1), S. 7–15.

So, Eui Young; Ouchi, Toru (2011): Functional interaction of BRCA1/ATM-associated BAAT1 with the DNA-PK catalytic subunit. In: *Experimental and therapeutic medicine* 2 (3), S. 443–447. DOI: 10.3892/etm.2011.232.

Soria-Bretones, Isabel; Sáez, Carmen; Ruíz-Borrego, Manuel; Japón, Miguel A.; Huertas, Pablo (2013): Prognostic value of CtIP/RBBP8 expression in breast cancer. In: *Cancer medicine* 2 (6), S. 774–783. DOI: 10.1002/cam4.141.

Speiser, Dorothee; Grabowski, Jacek P.; Schmitt, Wolfgang D. (2019): Aktuelle Aspekte in der BRCA-Diagnostik: Konsequenzen für Prävention und Therapie. In: *Der Onkologe* 25 (2), S. 107–113. DOI: 10.1007/s00761-018-0487-8.

Sy, Shirley M. H.; Huen, Michael S. Y.; Chen, Junjie (2009): PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. In: *PNAS* 106 (17), S. 7155–7160. DOI: 10.1073/pnas.0811159106.

Szymonowicz, Klaudia; Oeck, Sebastian; Krysztofiak, Adam; van der Linden, Jansje; Iliakis, George; Jendrossek, Verena (2018): Restraining Akt1 Phosphorylation Attenuates the Repair of Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks and Reduces the Survival of Irradiated Cancer Cells. In: *International journal of molecular sciences* 19 (8), S. 2233. DOI: 10.3390/ijms19082233.

Takaoka, Miho; Miki, Yoshio (2018): BRCA1 gene: function and deficiency. In: *International Journal of Clinical Oncology* 23 (1), S. 36–44. DOI: 10.1007/s10147-017-1182-2.

Taube, E. T.; Braicu, I.; Kunze, C. A.; Kulbe, H.; Schmitt, W. D.; Denkert, C. (2019): Aktuelle Aspekte der Diagnostik von Ovarialtumoren. In: *Der Onkologe* 25 (2), S. 99–106. DOI: 10.1007/s00761-018-0495-8.

Timmerman, Dirk; Ameye, Lieveke; Fischerova, Daniela; Epstein, Elisabeth; Melis, Gian Benedetto; Guerriero, Stefano et al. (2010): Simple ultrasound rules to distinguish between benign and malignant adnexal masses before surgery. Prospective validation by IOTA group. In: *BMJ* 341, c6839. DOI: 10.1136/bmj.c6839.



- Torre, Lindsey A.; Trabert, Britton; DeSantis, Carol E.; Miller, Kimberly D.; Samimi, Goli; Runowicz, Carolyn D. et al. (2018): Ovarian cancer statistics, 2018. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 68 (4), S. 284–296. DOI: 10.3322/caac.21456.
- Venkitaraman, Ashok R. (2001): Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. In: *Journal of Cell Science* 114 (20), S. 3591–3598.
- Vessey, M. P.; Painter, R. (1995): Endometrial and ovarian cancer and oral contraceptives--findings in a large cohort study. In: *British journal of cancer* 71 (6), S. 1340–1342.
- Villanueva, Teresa (2010): Genetics: Partners in crime. In: *Nature reviews. Cancer* 10 (11), S. 743.
- Wallwiener, D.; Grischke, E. M.; Brucker, S. Y.; Taran, F. A.; Bastert, G. (2017): Gynäkologische Onkologie: Schattauer GmbH. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=aSneDQAAQBAJ>.
- Wang, Bin (2012a): BRCA1 tumor suppressor network: focusing on its tail. In: *Cell & bioscience* 2 (1), S. 6. DOI: 10.1186/2045-3701-2-6.
- Wang, Hailong; Shao, Zhengping; Shi, Linda Z.; Hwang, Patty Yi-Hwa; Truong, Lan N.; Berns, Michael W. et al. (2012b): CtIP protein dimerization is critical for its recruitment to chromosomal DNA double-stranded breaks. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (25), S. 21471–21480. DOI: 10.1074/jbc.M112.355354.
- Wang, Junhui; Ding, Qianshan; Fujimori, Hiroaki; Motegi, Akira; Miki, Yoshio; Masutani, Mitsuko (2016): Loss of CtIP disturbs homologous recombination repair and sensitizes breast cancer cells to PARP inhibitors. In: *Oncotarget* 7 (7), S. 7701–7714. DOI: 10.18632/oncotarget.6715.
- Wang, Yiyang; Wang, Yue; Wei, Li; Hong, Shuhui; Zhao, Miaoqing; Zhang, Xi; Zheng, Wenxin (2017): BRCA1 expression, proliferative and apoptotic activities in ovarian epithelial inclusions. In: *Journal of ovarian research* 10 (1), S. 12. DOI: 10.1186/s13048-017-0307-6.
- Welsh, Piri L.; Owens, Kelly N.; King, Mary-Claire (2000): Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. In: *Trends in Genetics* 16 (2), S. 69–74. DOI: 10.1016/S0168-9525(99)01930-7.
- Wittekind, Christian (Hg.) (2017): TNM - Klassifikation maligner Tumoren. Union for International Cancer Control; Wiley-VCH. Achte Auflage. Weinheim: Wiley-VCH

Verlag GmbH & Co. KGaA. Online verfügbar unter <http://www.wiley-vch.de/publish/dt/books/ISBN978-3-527-34280-8/>.

Wu, Jiaxue; Lu, Lin-Yu; Yu, Xiaochun (2010): The role of BRCA1 in DNA damage response. In: *Protein & Cell* 1 (2), S. 117–123. DOI: 10.1007/s13238-010-0010-5.

Xu, C. F.; Solomon, E. (1996): Mutations of the BRCA1 gene in human cancer. In: *Seminars in cancer biology* 7 (1), S. 33–40. DOI: 10.1006/scbi.1996.0005.

Xu, Jianmin; Lv, Shun; Qin, Yan; Shu, Fang; Xu, Yanjuan; Chen, Jian et al. (2007): TRB3 interacts with CtIP and is overexpressed in certain cancers. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1770 (2), S. 273–278. DOI: 10.1016/j.bbagen.2006.09.025.

Yoshida, Kiyotsugu; Miki, Yoshio (2004): Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. In: *Cancer Science* 95 (11), S. 866–871. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2004.tb02195.x.

Yu, Xiaochun; Chini, Claudia Christiano Silva; He, Miao; Mer, Georges; Chen, Junjie (2003): The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. In: *Science (New York, N.Y.)* 302 (5645), S. 639–642. DOI: 10.1126/science.1088753.

Yun, Maximina H.; Hiom, Kevin (2009): Understanding the functions of BRCA1 in the DNA-damage response. In: *Biochemical Society transactions* 37 (Pt 3), S. 597–604. DOI: 10.1042/BST0370597.

Zhang, Weilong; Song, Ying; He, Xue; Liu, Xiaoni; Zhang, Ye; Yang, Zuozhen et al.: Prognosis value of RBBP8 expression in plasma cell myeloma. In: *Cancer Gene Ther*, S. 1–8. DOI: 10.1038/s41417-018-0069-3.

Zivanovic, O.; Oseledchyk, A. (2018): Indikation von CRS und HIPEC bei peritonealen Metastasen von Ovarialkarzinomen. In: Beate Rau, Pompiliu Ioan Piso und Alfred Königsrainer (Hg.): Peritoneale Tumoren und Metastasen. Operative, intraperitoneale und systemische Therapie. Berlin, Heidelberg: Springer, S. 213–221. Online verfügbar unter [https://doi.org/10.1007/978-3-662-54500-3\\_22](https://doi.org/10.1007/978-3-662-54500-3_22).

Zulauf, N.; Oremek, G. M.; Ohlendorf, D.; Brüggmann, D.; Groneberg, D. (2019): CA 125 – ein Tumormarker im Bereich der Diagnostik des Ovarialkarzinoms. In: *Zentralblatt für Arbeitsmedizin, Arbeitsschutz und Ergonomie* 69 (3), S. 150–152. DOI: 10.1007/s40664-018-0305-6.

## 9 Anhang

### 9.1 BRCA-Mutationsanalyse aus dem Softwareprogramm „PathoPro“

**Pathologische Begutachtung**

Betr: [REDACTED]  
Zugesandtes Material: 2 Paraffinblöcke [REDACTED]  
[REDACTED]

vielen Dank für die Übersendung repräsentativen Tumormaterials o.g. Patientin an dem wir  
wunschgemäß eine Next Generation Sequencing Analyse zur Fragestellung einer BRCA1/2-  
Mutation durchgeführt haben. Eigens angefertigte HE-Schnittpräparate zeigen Infiltrate eines  
serösen high-grade Adenokarzinoms des Ovars.

**Molekularpathologischer Befund:**  
Von einem histologischen Schnittpräparat mit repräsentativem Tumorgewebe wurde das  
gesamte Gewebe gewonnen und aus diesem DNA isoliert. In dem mikrodisssezierten Areal  
fanden sich etwa 70 % Tumorzellen.  
PCR-Analyse: Es wurde eine gezielte Mutationsanalyse mittels der Next Generation Se-  
quenzierungstechnologie (ION TORRENT-PGM) unter der Verwendung des BRCA1/2 Pa-  
nels (Life Technologies) durchgeführt. Mit diesem Panel-Sequenzierungsansatz wird der  
gesamte kodierende Bereich (CDS), also alle kodierenden Exone der BRCA-1 und BRCA-2-  
Gene sowie jeweils etwa 20 Basenpaare der jeweils angrenzenden Introne untersucht.  
Die Analyse erfolgte mit Hilfe der ION REPORTER Software v.5.0, indem auf nicht-  
synonyme Veränderungen gefiltert wurde. Von den verbleibenden Mutationen wurden dieje-  
nigen nicht berücksichtigt, die eine Allelfrequenz von unter 5% aufwiesen. Die restlichen  
Mutationen wurden individuell mit Hilfe des IGV (Integrated Genome Viewer, Broad Institute)  
auf das humane Genom (Referenz: hg19) abgebildet (alignment), um Sequenzfehler, insbe-  
sondere Homopolymere auszuschließen. Die Klassifikation der Mutationen erfolgte auf der  
Basis der öffentlichen Datenbanken ARUP (Association of regional and University Patholo-  
gists Inc.), BRCA Exchange, IRAC (Insituté Recherche Association Cancer), LOVD (Leiden  
Open Variation Database), NIH (National Insitutes of Health), UMD (Universal Mutation Da-  
tabase). Die Analyse erfolgte mit einer mittleren Lesetiefe (coverage) von 2601 reads/bp bei  
einer Abdeckung von 100% bei 20X und 98.98% bei 100X.

Hierbei wurden sechs Mutationen im BRCA1- und zwei Mutationen im BRCA2-Gen nachge-  
wiesen, die mit nicht synonymen Aminosäureaustauschen einhergehen. Alle BRCA1-und  
eine der beiden BRCA2-Mutationen werden nach IACR-Klassifikation (Plon SE et al., Hum  
Mutat 2008, 29, 1282) als Klasse 1-Variante (nicht pathogen/ keine klinische Signifikanz)  
eingestuft.

Die Mutation BRCA2: chr13:32945179, NM\_000059.3, c.8574A>T, Exon 20, p.Gln2858His, coverage: 35, allele frequency: 20% zunächst als Klasse 3 VUS (variant of unknown significance) einzuordnen. Eine weiterführende Analyse mit Hilfe der Proteinanalyse Modelle ClinVar, MUT@STER, PolyPhen, SIFT ordnet dieser Mutation jedoch pathogene Eigenschaften zu, weshalb diese Mutation abschließend als Klasse 4-Mutation eingestuft wird.

**Begutachtung:**

Seröses high-grade Adenokarzinom des Ovars mit Nachweis einer klinisch relevanten BRCA2-Mutation.

Somit kommt der Tumor dieser Patientin nach dem Zulassungstext (EMA/CHMP/632090/2014) der EMA (European Medicines Agency), für eine zielgerichtete Inhibition der PARP (Poly-(ADPRibose)- Polymerase) mittels Olaparib in Betracht.

Mit freundlichen Grüßen

## Molekularpathologische Begutachtung

### NGS-BRCA1/2

#### MOLEKULARPATHOLOGISCHE BEGUTACHTUNG

Von einem histologischen Schnittpräparat mit repräsentativem Tumorgewebe wurde das gesamte Gewebe gewonnen und aus diesem DNA isoliert. In dem mikrodissezierten Areal fanden sich etwa 70 % Tumorzellen.

**PCR/ Analyse:** Es wurde eine gezielte Mutationsanalyse mittels der Next Generation Sequenzierungstechnologie (ION TORRENT-PGM) unter der Verwendung des BRCA1/2 Panels (Life Technologies) durchgeführt. Mit diesem Panel-Sequenzierungsansatz wird der gesamte kodierende Bereich (CDS), also alle kodierenden Exone der BRCA-1 und BRCA-2 Gene sowie jeweils etwa 20 Basenpaare der jeweils angrenzenden Introne untersucht.

**Analyse:** Diese erfolgte mit Hilfe der ION REPORTER Software v.5.0, indem auf nicht-synonyme Veränderungen gefiltert wurde. Von den verbleibenden Mutationen wurden diejenigen nicht berücksichtigt, die eine Allelfrequenz unter 5% aufwiesen. Die restlichen Mutationen wurden individuell mit Hilfe des IGV (Integrated Genome Viewer, Broad Institute) auf das humane Genom (Referenz: hg19) abgebildet (alignment), um Sequenzfehler, insbesondere Homopolymere auszuschließen. Die Klassifikation der Mutationen erfolgte auf der Basis der öffentlichen Datenbanken ARUP (Association of regional and University Pathologists Inc.), BRCA Exchange, IRAC (Institut Recherche Association Cancer), LOVD (Leiden Open Variation Database), NIH (National Institutes of Health), UMD (Universal Mutation Database).

Die Analyse erfolgte mit einer mittleren Lesetiefe (coverage) von 2601 reads/bp bei einer Abdeckung von 100% bei 20X und 98.98% bei 100X.

#### **Molekularpathologische Begutachtung**

Hierbei wurden sechs Mutationen im BRCA1- und zwei Mutationen im BRCA2 Gen nachgewiesen, die mit nicht synonymen Aminosäureaustauschen einhergehen. Alle BRCA1 und eine der beiden BRCA2 Mutationen werden nach IACR-Klassifikation (Plon SE et al., Hum Mutat 2008, 29, 1282) als Klasse 1- Variante (nicht pathogen/ keine klinische Signifikanz) eingestuft.

Die Mutation BRCA2: chr13:32945179, NM\_000059.3, c.8574A>T, Exon 20, p.Gln2858His, coverage: 35, allele frequency: 20% wird als Klasse 3 VUS (variant of unknown significance) eingeordnet. Eine weiterführende Analyse mit Hilfe der Proteinanalyse Modelle ClinVar,

Diese Begutachtung ist in PathoPro abrufbar.



MUT@STER, PolyPhen, SIFT ordnet dieser Mutation pathogene Eigenschaften zu, weshalb diese Mutation als Klasse 4 Mutation eingestuft wird.

Somit kommt der Tumor dieser Patientin nach dem Zulassungstext (EMA/CHMP/632090/2014) der EMA (European Medicines Agency), für eine zielgerichtete Inhibition der PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) mittels Olaparip in Betracht.

Bitte eine für diesen Fall spezifische abschließende Zusammenfassung aus Histo- und Molekularpathologie in den pathologischen Befund einarbeiten.

#### ZUSATZINFORMATION

Diese Information ist NICHT für die abschließende Pathologische Begutachtung gedacht, sondern dient als zusätzliche Informationsquelle zum Verständnis.

Die vorliegende Analyse zielte auf die Analyse des Mutationszustands der BRCA-Gene im Tumorgewebe ab. Rückschlüsse über das mögliche Vorliegen einer Keimbahnmutation lassen sich aus der vorliegenden Analysen nicht ziehen, weil für die Analyse Tumorgewebe oder cfDNA (circulating free DNA) eingesetzt wurden, die beide ein Gemisch aus der DNA von normalen- und Tumorzellen darstellen. Deshalb erlaubt das Finden einer Mutation lediglich als unbeabsichtigten Nebeneffekt der Analyse den Verdacht auf eine Keimbahnmutation. Um diese Frage zu klären, ist eine humangenetische Keimbahnbestimmung mit entsprechender Beratung erforderlich.

#### Methode

Kommerzielles System: Life Technologies - ION TORRENT~Personal Genome Machine - BRCA1/2 Panel.  
Verfahren validiert: Ringversuch 2015.

position	gene	base change	Exon	reference mRNA	amino acid change	coverage	allele frequency	1000G	SIFT	PolyPhen	db	db	COSMIC	SNP
chr13:32929887	BRCA2	c.739T>C	14	NM_000059.3	p.Val2466Ala	506	100	2.42%	0	0	0	class1		rs189547
chr13:32961179	BRCA2	c.857A>T	20	NM_000059.3	p.Gln2858Glu	35	20	0%	5	0	0	class4		rs80358718
chr17:41222975	BRCA1	c.5019G>A	15	NM_007300.3	p.Met1673Ile	3996	29.7	0%	0	0	0	class1		rs1799967
chr17:41223096	BRCA1	c.4900A>G	17	NM_007300.3	p.Ser1634Gly	3912	26.15	35.54%	0	0	0	class1		rs1799966
chr17:41244000	BRCA1	c.3548A>G	9	NM_007300.3	p.Lys1183Arg	828	28.14	35.26%	0	0	0	class1	C09M348277	rs35842, rs80357956
chr17:41244435	BRCA1	c.3115A>G	9	NM_007300.3	p.Gln398Gly	1049	30.03	0%	0	0	0	class1		rs18943, rs80357930
chr17:41244936	BRCA1	c.2613C>T	9	NM_007300.3	p.Pro471Leu	1220	30.49	0%	0	0	0	class1	C09M348278	rs1799917, rs80357963
chr17:41246481	BRCA1	c.1047A>G	10	NM_007300.3	p.Gln356Arg	2009	75.53	2.8%	5	0	0	class1		rs1799950, rs80357796

## 9.2 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Kirchner für die Durchführung dieser Arbeit unter seiner Institutsleitung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Mayr für die überaus gute Betreuung und Hilfestellung zu jeder Zeit.

Bei Frau Christina Kuhn möchte ich mich für die Anleitung und Unterstützung des praktischen Teils dieser Arbeit im Labor bedanken. Sie hatte immer ein offenes Ohr und die nötige Geduld, mich in die Grundzüge der Immunhistochemie einzuarbeiten.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. Elisa Schmoeckel, die sich selbst während eines deutschen Fussball-WM-Spiels im Sommer 2018 Zeit nahm, mit mir ins Mikroskop zu schauen. Frau Andrea Sendelhofert danke ich für die Unterstützung beim Färben der histologischen Schnitte.

Zum Schluss danke ich meinen Freunden und meiner Familie, die mich stets motiviert haben weiterzumachen, wenn die Frustrationstoleranz mal wieder an Höhe zu verlieren drohte.

### **9.3 Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Sarah Landgrebe, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Immunhistochemische und molekulare Untersuchungen BRCA1/2 mutierter Ovarialkarzinome

Korrelation der gewonnenen Daten mit den klinischen Daten, den histologischen Befunden und dem Überleben

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines Akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 27.10.2021

Sarah Landgrebe